



# Développement d'une méthode de séparation chromatographique couplée aux spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) : application à l'analyse de spéciation des lanthanides

Ludovic Beuvier

## ► To cite this version:

Ludovic Beuvier. Développement d'une méthode de séparation chromatographique couplée aux spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) : application à l'analyse de spéciation des lanthanides. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066594 . tel-01381095

**HAL Id: tel-01381095**

**<https://theses.hal.science/tel-01381095>**

Submitted on 14 Oct 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université Pierre et Marie Curie

École doctorale :

Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

*Laboratoire de développement analytique nucléaire isotopique et élémentaire*

## **Développement d'une méthode de séparation chromatographique couplée aux spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) : application à l'analyse de spéciation des lanthanides**

Par Ludovic BEUVIER

Thèse de doctorat de chimie physique et chimie analytique

Dirigée par Frédéric CHARTIER et Valérie PICHON

Présentée et soutenue publiquement le 12 octobre 2015

Devant un jury composé de :

Pr. Claire ELFAKIR

Pr. José Luis TODOLI TORRO

Dr. Petru JITARU

Dr. Isabelle MABILLE

Dr. Frédéric CHARTIER

Pr. Valérie PICHON

Dr. Carole BRESSON

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Membre invité

Encadrant CEA



*À Isabelle*



## Résumé

---

Ces travaux de thèse concernent les développements d'une méthode de séparation chromatographique couplée simultanément à l'ESI-MS et l'ICP-MS afin de réaliser l'analyse de spéciation exhaustive des lanthanides en phase aqueuse représentative des phases de dés extraction des procédés de traitement du combustible usé. Cette méthode analytique permet de séparer, caractériser et quantifier des complexes de lanthanides à ligands polyaminocarboxyliques comme le DTPA et l'EDTA, utilisés comme agents complexants dans ces procédés. La méthode de séparation par chromatographie HILIC des complexes de lanthanides a été mise au point avec la phase stationnaire à fonctions amide. Un criblage d'une large gamme de compositions de phase mobile a permis de déterminer que le mécanisme d'adsorption est prédominant lors l'élution des complexes de lanthanides et d'obtenir des conditions de séparation optimisées. Des conditions d'analyse plus rapides obtenues avec une colonne à fonctions amide de granulométrie sub-2  $\mu\text{m}$  et de longueur plus faible ont permis de réduire le temps d'analyse d'un facteur 2,5 et la consommation de solvant de 25 %. La caractérisation structurale et isotopique par HILIC ESI-MS a été réalisée ainsi que la mise au point d'une méthode d'étalonnage externe. Les performances analytiques de la méthode de quantification ont été déterminées. Enfin, le développement d'un système de couplage de l'HILIC à l'ESI-MS et l'ICP-MS a été réalisé. Une méthode de quantification simultanée par ESI-MS et par ICP-MS a permis de déterminer la distribution quantitative des espèces en solution ainsi que les performances analytiques associées.

**Mots clés :** spéciation, lanthanides, complexes, HILIC, ESI-MS, ICP-MS

## Abstract

---

This work focuses on the development of a chromatographic separation method coupled to both ESI-MS and ICP-MS in order to achieve the comprehensive speciation analysis of lanthanides in aqueous phase representative of back-extraction phases of advanced spent nuclear fuel treatment processes. This analytical method allowed the separation, the characterization and the quantitation of lanthanides complexes holding polyaminocarboxylic ligands, such as DTPA and EDTA, used as complexing agents in these processes. A HILIC separation method of lanthanides complexes has been developed with an amide bonded stationary phase. A screening of a wide range of mobile phase compositions demonstrated that the adsorption mechanism was predominant. This screening allowed also obtaining optimized separation conditions. Faster analysis conditions with shorter amide column packed with sub 2  $\mu\text{m}$  particles reduced analysis time by 2.5 and 25% solvent consumption. Isotopic and structural characterization by HILIC ESI-MS was performed as well as the development of external calibration quantitation method. Analytical performances of quantitation method were determined. Finally, the development of the HILIC coupling to ESI-MS and ICP-MS was achieved. A simultaneous quantitation method by ESI-MS and ICP-MS was performed to determine the species quantitative distribution in solution. Analytical performances of quantitation method were also determined.

**Keywords:** speciation, lanthanides, complexes, HILIC, ESI-MS, ICP-MS



# Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Monsieur Moutiers, chef du service d'études analytiques et de réactivité des surfaces (SEARS), pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du CEA.

Je remercie ensuite Monsieur Vercouter, chef du laboratoire de développement analytique, nucléaire, isotopique et élémentaire (LANIE) pour avoir mis à ma disposition le parc analytique qui m'a permis d'atteindre l'objectif de ma thèse : réaliser le couplage entre l'HILIC, l'ESI-MS et l'ICP-MS. Je remercie mon encadrement, mon directeur de thèse, Monsieur Chartier, ma co-directrice de thèse, Madame Pichon et mes encadrants au CEA, Madame Bresson et Monsieur Nonell pour le temps qu'ils m'ont consacré au cours de mes trois années de thèse.

Je tiens également à remercier les membres du jury de ma soutenance de thèse, la présidente Madame Mabile, les rapporteurs Madame Elfakir et Monsieur Todoli Torro et l'examineur, Monsieur Jitaru, pour avoir évalué mon travail.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères à Yasmine, Mathias, mes co-bureaux au pigeonier qui ont été présents pendant ces trois ans et avec qui j'ai pu échanger de manière constructive. Merci Yasmine pour les courriels sympathiques de « Princesse Pigeon » et les liens qui permettent de rigoler et de faire tomber la pression. Merci Mathias pour les post-it sur mon écran, la modification de la résolution de mon écran lorsque j'oubliais de verrouiller ma session, d'avoir suspendu mes chaussures au plafond... Toutes ces petites attentions qui m'ont aidé à relativiser et à garder le sourire au boulot.

Je remercie également la nouvelle génération de pigeons, Imane, Chirelle, Elodie, Marion, Benoit, Brice, Sébastien pour les repas du vendredi que j'ai pu passer avec vous. Remerciements spéciaux à Benoit et Chirelle pour respectivement les pauses « verre d'eau » et les goûters de 18h.

Je voudrais également remercier les autres habitants du 391 qui m'ont soutenu tout au long de ces trois années de thèse : Germain, Guillaume, Amélie, Florence, Gwendoline, Sacha, Pauline et plus particulièrement Mylène pour sa bonne humeur et ses chansons de la reine des neiges.



Merci Solenne, Nico, Pierrick pour les après-midis « jeux de société » et les soirées du dimanche soir anti-lundinite.

Je tiens maintenant à remercier particulièrement Anne et Philippe pour les corrections de mon manuscrit, leur conseil syntaxique et leur soutien. Merci à Julien pour l'espoir qu'il m'a donné. Je remercie sincèrement mes parents pour leurs conseils sur le monde du travail, leurs encouragements, leur réconfort, les weekends à Poligny où j'ai pu me ressourcer avec des jeux et des balades. Merci Laurianne et Jonathan pour vos coups de fil où vous m'avez changé les idées, fait rire...

Je finirai mes remerciements par ceux que j'adresse chaleureusement à ma fiancée Isabelle, à qui je dédicace cette thèse. Sans elle, ce travail n'aurait pas eu lieu et je ne serais pas Docteur en chimie analytique. Merci d'avoir été là, à chaque instant de ces 36 mois. Ta présence réconfortante, tes sourires, nos fou-rires, nos weekends, tes petites histoires, nos soirées « séries » m'ont permis de soutenir ma thèse. Avec toi, les épreuves de la vie ne sont que de ridicules monticules. Merci du fond de mon cœur Isabelle.

# Table des matières

<b>Introduction générale .....</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre I Généralités .....</b>	<b>33</b>
<b>1 Définitions et rappels .....</b>	<b>34</b>
1-a) Propriétés physico-chimiques et de coordination des lanthanides .....	34
1-a-1) Configuration électronique et états d'oxydation .....	35
1-a-1) Rayon ionique .....	36
1-a-2) Hydratation et hydrolyse des lanthanides.....	37
1-a-3) Propriétés de coordination des lanthanides .....	38
1-b) La spéciation .....	42
1-b-1) Définitions et domaines d'application .....	42
1-b-2) Stratégies mises en œuvre en analyse de spéciation.....	43
<b>2 Techniques analytiques considérées pour l'étude de spéciation des lanthanides .....</b>	<b>44</b>
2-a) La chromatographie d'interaction hydrophile HILIC .....	45
2-a-1) Mécanismes de rétention.....	46
2-a-2) Phases stationnaires .....	47
2-a-3) Paramètres chromatographiques significatifs.....	51
2-a-4) Avantages et applications.....	54
2-b) La spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS).....	56
2-b-1) Principe.....	56
2-b-2) Couplages avec des techniques séparatives .....	61
2-b-3) Avantages et limites .....	62
2-c) La spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS).....	62
2-c-1) Principe .....	63
2-c-2) Couplages de l'ICP-MS avec des méthodes séparatives .....	67
2-c-3) Avantages et limites.....	68
<b>Chapitre II Étude bibliographique.....</b>	<b>71</b>
<b>1 Séparation chromatographique d'espèces de lanthanides selon différents modes de rétention.....</b>	<b>72</b>
<b>2 Application du mode HILIC à l'analyse de spéciation des métaux et des lanthanides .....</b>	<b>82</b>
2-a) Les métaux lourds et de transition .....	83
2-b) Les organo-éléments .....	90
2-c) Les lanthanides .....	96
<b>3 Analyse de spéciation par différents types de chromatographies couplées simultanément à l'ESI-MS et l'ICP-MS .....</b>	<b>104</b>
<b>4 Conclusion .....</b>	<b>109</b>
<b>Chapitre III Séparation et caractérisation des complexes de Ln en mode HILIC couplé à la spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray.....</b>	<b>111</b>
<b>1 Système d'étude .....</b>	<b>112</b>

<b>2 Sélection de phases stationnaires pour la séparation de complexes de lanthanides en mode HILIC .....</b>	<b>115</b>
2-a) Évaluation de la sélectivité de différentes phases stationnaires polaires .....	115
2-b) Sélection de la phase stationnaire à fonctions amide la plus performante .....	121
<b>3 Caractéristiques de rétention des complexes de lanthanides en mode HILIC.....</b>	<b>128</b>
3-a) Impact de la variation du pourcentage d'acétonitrile .....	129
3-b) Impact de la variation de la concentration d'acétate d'ammonium .....	131
3-c) Étude des mécanismes de rétention .....	131
<b>4 Vers des conditions d'analyse rapide de type « fast HPLC » .....</b>	<b>135</b>
<b>5 Identification structurale des complexes de lanthanides .....</b>	<b>139</b>
<b>6 Conclusion .....</b>	<b>142</b>
<b><i>Chapitre IV Quantification de complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS.....</i></b>	<b><i>145</i></b>
<b>1 Analyse de spéciation quantitative par ESI-MS.....</b>	<b>146</b>
<b>2 Système d'étude .....</b>	<b>148</b>
<b>3 Développement d'une méthode de quantification des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS .....</b>	<b>152</b>
3-a) Type d'étalonnage .....	152
3-b) Mode d'acquisition et transitions de fragmentation .....	158
3-c) Performances analytiques .....	161
<b>4 Potentiel d'utilisation de l'ESI-MS pour des études de caractérisation isotopique .....</b>	<b>168</b>
<b>5 Conclusion .....</b>	<b>175</b>
<b><i>Chapitre V Vers l'analyse de spéciation exhaustive : mise au point du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC avec l'ESI-MS et l'ICP-MS.....</i></b>	<b><i>177</i></b>
<b>1 Faisabilité du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC avec l'ESI-MS et l'ICP-MS .....</b>	<b>178</b>
1-a) Dimensionnement d'un système de couplage spécifique .....	178
1-b) Mise en œuvre du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC avec l'ICP-MS et l'ESI-MS.....	185
<b>2 Premiers essais de quantification des complexes de lanthanides en parallèle par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS.....</b>	<b>189</b>
2-a) HILIC ESI-MS.....	190
2-a-1) Linéarité de la réponse du signal .....	190
2-a-2) Répétabilité et justesse de la mesure.....	191
2-b) HILIC ICP-MS .....	193
2-b-1) Linéarité de la réponse du signal.....	193
2-b-2) Répétabilité et justesse de la mesure .....	195
<b>3 Distribution des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS.....</b>	<b>197</b>
3-a) Distribution des espèces obtenues avec chaque spectromètre de masse.....	197
3-b) Réponse des complexes de lanthanides en ESI-MS.....	200
<b>4 Conclusion .....</b>	<b>203</b>

<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>205</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>211</b>
Annexe 1 : structures des agents de contraste à base de gadolinium .....	212
Annexe 2 : modes de séparation chromatographiques .....	213
Annexe 3 : données chromatographiques .....	217
Annexe 4 : matériels et méthodes .....	219
<b>Références.....</b>	<b>231</b>



# Table des figures

Figure 1 : représentation schématique de la séparation sélective des actinides.....	28
Figure 2 : séparation chromatographique couplée simultanément aux spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS).....	30
Figure 3 : séries des lanthanides .....	34
Figure 4 : niveaux d'énergie des électrons de valence du gadolinium (adapté de [6]).....	35
Figure 5 : sphère d'hydratation d'un cation lanthanide. Zone A : sphère interne de solvation. Zone B : sphère externe de solvation. Zone C : zone désordonnée. Zone D : zone non influencée [11] .....	38
Figure 6 : structure a) du DTPA b) de l'EDTA.....	40
Figure 7 : évolution des constantes de complexation absolues des complexes Ln-EDTA (en bleu) et Ln-DTPA (en rouge) en fonction du rayon ionique (échelle décroissante) ; données issues des tableaux 1 et 3 [10,15,16].....	41
Figure 8 : l'HILIC, combinaison des caractéristiques de la RP-HPLC, la NP-HPLC et l'IC (adapté de [24]).....	45
Figure 9 : évolution du nombre de publications sur l'HILIC d'après web of Science .....	46
Figure 10 : comportement général d'un composé polaire en HILIC : a) rétention à haut pourcentage d'acétonitrile b) élution lorsque que la force éluante de la phase mobile augmente [26].....	47
Figure 11 : séparation de neurotransmetteurs dans les mêmes conditions de phase mobile, avec différents types de phases stationnaires. Phase mobile : 80/20 acétonitrile/eau (v/v), [acétate d'ammonium] = 20 mM, pH 3 [29].....	49
Figure 12 : séparation de composés polaires avec différentes phases stationnaires. Phase mobile a) 85/15 AcN/H <sub>2</sub> O (v/v) avec 5 mM de formate d'ammonium, pH 3,0 b) 95/05 AcN/H <sub>2</sub> O (v/v) avec 5 mM de formate d'ammonium, pH 3,0 composés : 1) phénol ; 2) acide 2-naphthalènesulfonique ; 3) acide p-xylènesulfonique ; 4) caféine ; 5) nortriptyline ; 6) diphénhydramine ; 7) benzylamine ; 8) procainamide [28]. .....	52
Figure 13 : variation du facteur de rétention de la cytosine en fonction du pourcentage d'acétonitrile et de la phase stationnaire. Groupements amine (carré), zwitterionique (croix), amide (losange) et silice vierge (triangle). Phase mobile : acétonitrile/eau contenant 5 mM d'acétate d'ammonium [36] .....	53
Figure 14 : processus d'obtention des ions en spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (adapté de [51]).....	56
Figure 15 : a) source d'ionisation b) spray de l'ESI-MS TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher) .....	58
Figure 16 : configurations instrumentales des couplages avec l'ESI-MS [53] .....	61
Figure 17 : schéma de la source plasma à couplage inductif (adapté de [57]).....	63
Figure 18 : interface et optique ionique d'un ICP-MS.....	65

Figure 19 : a) source d'ionisation b) plasma de l'ICP-MS X series II (Thermo Fisher).....	65
Figure 20 : configurations instrumentales classiques des couplages avec l'ICP-MS [53].....	67
Figure 21 : séparation de complexes de gadolinium par a) IP-HPLC-UV avec dérivation post colonne (conditions voir Tableau 6 [79]) par b) RP-HPLC ICP-OES (conditions voir Tableau 6 [74]).....	78
Figure 22 : séparation de deux complexes de lanthanides, Gd-motexafin (GdTex) et Lu-motexafin (LuTex) par RP-HPLC couplé à la spectrométrie UV dans du plasma humain (colonne Zorbax Eclipse XDB-C 18 (150 x 3 mm, 3,50 $\mu$ m) ; 100 mM d'acétate d'ammonium (pH 4,3)/acétonitrile/méthanol 59/21/20 ; débit = 0,6 mL.L <sup>-1</sup> ) [88].....	80
Figure 23 : séparation de complexes de métaux par HILIC ESI-MS avec une phase stationnaire à fonctions zwitterioniques DMA : acide 2'-déoxymuginéique ; NA : nicotianamine ; MA : acide muginéique ; epi-HMA : acide 3-epi-hydroxymuginéique [95] (conditions voir Tableau 7).....	89
Figure 24 : séparation d'agents de contraste par HILIC ICP-MS a) avec une phase stationnaire zwitterionique (conditions voir Tableau 10 [118]) b) avec une phase stationnaire de silice vierge à particules superficiellement poreuses (conditions voir Tableau 10 [114]). Les structures des complexes sont présentées en annexe 1.....	100
Figure 25 : comparaison des signaux du Gd-BT-D03A (annexe 1) obtenus par HILIC ICP-MS c=10 nmol.L <sup>-1</sup> ) en utilisant une chambre de nébulisation de Scott (gris) et un désolvateur (noir) (condition de séparation voir Tableau 10 [114]).....	101
Figure 26 : a) séparation de complexes de gadolinium (courant d'ion extrait) (conditions chromatographiques voir Tableau 10 [117]) b) spectres de masse de chaque complexe séparé (enveloppe) avec leur spectre théorique (bâtonnet).....	103
Figure 27 : séparation de complexes d'arsenic par RP-HPLC couplée simultanément à l'ESI-MS et l'ICP-MS. Phase stationnaire : Spherisorb ODS2 (250x4.6 mm ; 5 $\mu$ m). Phase mobile gradient eau/méthanol ; acide formique 1 %. PC : phytochelatine ; GS : glutathion. [128].....	105
Figure 28 : séparation d'un échantillon modèle contenant trois organosélénies (SeMSC : Se-méthylsélénométhylcystéine ; SeMet : sélénométhionine ; SeEt : L-Sélénéthionine) par IP-HPLC couplée simultanément à l'APCI-MS et l'ICP-MS [131] (colonne Supelco Discovery HS C18 (20 x 2,1 mm ; 3 $\mu$ m) ; phase mobile : eau/méthanol 75/25 (v/v) ; [acide formique] = 10 mM ; [acide perfluoroheptanoïque] = 1mM ; pH 2,8).....	107
Figure 29 : séparation d'organoarséniés par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS en mode gradient. SIM 1 et SIM 2 correspondent aux deux modes de détection appliqués en ESI-MS [110] (colonne ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm ; 3,5 $\mu$ m) ; phase mobile : gradient de 78/22 à 70/30 ACN/Acétate d'ammonium (125 mmol.L <sup>-1</sup> , pH 8,3)).....	108
Figure 30 : série des lanthanides. En rouge les lanthanides sélectionnés.....	112
Figure 31 : structure a) du DTPA b) de l'EDTA.....	112

Figure 32 : diagramme de spéciation théorique des espèces a) du DTPA b) de l'EDTA en fonction du pH pour $[DTPA]_T = [EDTA]_T = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . L.....	113
Figure 33 : diagramme de spéciation de l'euporium en présence a) du DTPA et b) de l'EDTA en condition stœchiométrique $[Eu] = [DTPA]_T = [EDTA]_T = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....	114
Figure 34 : diagramme de spéciation de l'euporium en présence d'EDTA en excès ; $[Eu] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; $[EDTA]_T = 1,25.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....	115
Figure 35 : chromatogrammes des complexes Ln-DTPA dans les proportions Ln:DTPA 1:1,25 avec $[Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et avec une phase stationnaire à fonctions a) zwitterioniques b) cyano c) diol. Phase mobile : 70/30 (v/v) acétonitrile/eau $[NH_4CH_3COO] = 5 \text{ mmol.L}^{-1}$ 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,1 mL.min <sup>-1</sup> . $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ . d) spectre de masse extrait du pic chromatographique de la Figure 35a.....	118
Figure 36 : chromatogramme des complexes Ln-DTPA dans les proportions Ln:DTPA 1:1,25 avec $[Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et avec la colonne TSK gel amide. Phase mobile : 70/30 (v/v) acétonitrile/eau $[NH_4CH_3COO] = 5 \text{ mmol.L}^{-1}$ 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,1 mL.min <sup>-1</sup> . $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ .....	120
Figure 37 : courbe de Knox de a) la colonne XBridge (150 x 2,1 mm ; 3,5 $\mu\text{m}$ ) et b) la colonne TSK gel 80 (. Phase mobile : 68/32 (v/v) acétonitrile/eau $[NH_4CH_3COO] = 5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; 0,5 % d'acide formique. $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ .....	122
Figure 38 : séparation des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Gd, Er) avec a) la colonne XBridge et b) la colonne TSK gel. Phase mobile : 68/32 (v/v) acétonitrile/eau, 0,5 % d'acide formique ; $[NH_4CH_3COO] = 20 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Débit = 0,15 mL.min <sup>-1</sup> . $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ . $[Nd] = [Gd] = [Er] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$	123
Figure 39 : évolution du facteur de rétention des complexes de lanthanides (Nd, Eu, Gd, Er) en fonction du pourcentage d'acétonitrile. Colonne XBridge (150 x 2,1 mm, 3,5 $\mu\text{m}$ ), $[NH_4CH_3COO] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$ 0,5 % d'acide formique. Débit : 0,15 mL.min <sup>-1</sup> , $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ .....	129
Figure 40 : évolution du log k en fonction du % H <sub>2</sub> O pour les complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Ln = Nd, Eu, Gd, Er) ; colonne XBridge (150 x 2,1 mm, 3,5 $\mu\text{m}$ ), $[NH_4CH_3COO] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$ 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,15 mL.min <sup>-1</sup> , $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ .....	132
Figure 41 : évolution du log k en fonction du log % H <sub>2</sub> O pour les complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) ; colonne XBridge (150 x 2,1 mm, 3,5 $\mu\text{m}$ ), $[NH_4CH_3COO] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$ 0,5 % d'acide formique. Débit : 0,15 mL.min <sup>-1</sup> , $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ .....	133
Figure 42 : chromatogramme de la séparation des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Nd) en mode isocratique. Colonne XBridge : 150 x 2,1 mm, 3,5 $\mu\text{m}$ . Phase mobile : ACN/H <sub>2</sub> O (70/30) $[NH_4CH_3COO] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$ 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,15 mL.min <sup>-1</sup> . $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$ Proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 $[Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....	134
Figure 43 : chromatogramme de la séparation des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) en mode isocratique. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu\text{m}$ ), 70/30 (v/v) acétonitrile/eau	



$[NH_4CH_3COO] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$ 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min <sup>-1</sup> . $V_{inj} = 3 \mu\text{L}$ ; Proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; $[Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....	137	
Figure 44: Spectres de masse ESI-MS(-) extraits de chaque pic chromatographique de la séparation des complexes Ln-DTPA/EDTA (Nd, Eu, Gd, Nd) en mode isocratique. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu\text{m}$ ), ACN/H <sub>2</sub> O (70/30) $[NH_4CH_3COO] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$ 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min <sup>-1</sup> . $V_{inj} = 3 \mu\text{L}$ ; proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; $[Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ ; a) complexe Nd-EDTA b) complexe Eu-EDTA c) complexe Gd-EDTA d) complexe Nd-DTPA e) complexes Eu-DTPA, Gd-DTPA, Er-EDTA e) Er-DTPA. ....		140
Figure 45 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu\text{m}$ ), 70/30 (v/v) ACN/H <sub>2</sub> O ; $[NH_4CH_3COO] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min <sup>-1</sup> . $V_{inj} = 3 \mu\text{L}$ ; proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; $[Sm] = [Nd] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....		150
Figure 46 : spectres de masse ESI-MS en mode d'ionisation négatif extraits de chaque pic chromatographique de la séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA en mode isocratique. a) complexe Sm-DTPA b) complexe Nd-DTPA c) complexe Sm-EDTA d) complexe Nd-EDTA.....		151
Figure 47 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec a) les étalons de Tm b) les étalons de Tb. Conditions chromatographiques voir Figure 45 $[Sm] = [Nd] = [Tm] = [Tb] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Ellipse verte : étalon sélectionné ; rectangle rouge : étalon rejeté.....		154
Figure 48 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec les étalons de Tm-DTPA et Tb-EDTA. Conditions chromatographiques voir Figure 45. $[Sm] = [Nd] = [Tm] = [Tb] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....		155
Figure 49 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec a) l'étalon de Tb-DTPA b) l'étalon de Tb-EDTA. Conditions chromatographiques voir Figure 45 $[Sm] = [Nd] = [Tb] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....		155
Figure 50 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec l'étalon de Tb-DTPA. Conditions chromatographiques voir Figure 45 $[Sm] = [Nd] = [Tb] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....		156
Figure 51 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec les étalons de Tb-DTPA à pH 6,8. Conditions chromatographiques voir Figure 45 ; $[Sm] = [Nd] = [Tb] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .....		157
Figure 52 : spectre de fragmentation par ESI-MS, en injection directe avec une énergie de collision de 19 V et un $\Delta m$ de 10 a) du $[Sm-DTPA+H]^+$ b) du $[Nd-DTPA+H]^+$ c) du $[Sm-EDTA]^+$ d) du $[Nd-EDTA]^+$ .....		159
Figure 53 : fragmentation du DTPA avec perte de $C_6H_9NO_4$ .....		160

Figure 54 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu$ m), 70/30 (v/v) ACN/H <sub>2</sub> O ; [NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO] = 15 mmol.L <sup>-1</sup> ; 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min <sup>-1</sup> . V <sub>inj</sub> = 3 $\mu$ L; proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; [Ln <sup>3+</sup> ] = 1.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> ([Sm] = [Nd]) .....	162
Figure 55 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu$ m), 70/30 (v/v) ACN/H <sub>2</sub> O ; [NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO] = 15 mmol.L <sup>-1</sup> ; 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min <sup>-1</sup> . V <sub>inj</sub> = 3 $\mu$ L; proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; [Ln <sup>3+</sup> ] = 1.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ([Sm] = [Nd]) .....	162
Figure 56 : variation de l'intensité des complexes de lanthanide séparés par HILIC ESI-MS en fonction de la concentration de chaque espèce : a) Sm-DTPA, b) Nd-DTPA, c) Sm-EDTA d) Nd-EDTA. Les droites noires : droites de régression linéaire. Droites rouges pointillées : limites du domaine de linéarité validées par les tests statistiques.....	165
Figure 57 : spectre de masse théorique du [Sm-DTPA+H] <sup>+</sup> a) en mode profil b) en mode centroïde .....	170
Figure 58 : schéma de principe du couplage simultané entre la chromatographie en mode HILIC, l'ESI-MS et l'ICP-MS, avec les différents débits dans chaque partie du montage.....	180
Figure 59 : séparation des complexes Sm-DTPA, Nd-DTPA, SM-EDTA et Nd-EDTA par HILIC ESI-MS. Phase stationnaire Acquity (100 x 2,1 mm ; 1,7 $\mu$ m). Phase mobile : 70/30 (v/v) acétonitrile/eau ; 15 mmol.L <sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium ; 0,5 % d'acide formique. Débit : 0,3 mL.min <sup>-1</sup> . V <sub>inj</sub> : 3 $\mu$ L. ....	182
Figure 60 : schéma de principe du couplage simultané entre l'HILIC, l'ESI-MS et l'ICP-MS avec l'ensemble des paramètres instrumentaux .....	184
Figure 61: a) connectique en T sans volume mort b) chambre de mélange de faible volume .....	184
Figure 62 : Séparation en mode isocratique des complexes Sm-DTPA, Sm-EDTA, Nd-DTPA et Nd-EDTA par HILIC couplée simultanément à a) l'ESI-MS et b) l'ICP-MS. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 $\mu$ m), 70/30 (v/v) acétonitrile/eau [NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO] = 15 mmol.L <sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min <sup>-1</sup> . V <sub>inj</sub> = 3 $\mu$ L; Proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; [Sm] = [Nd] = 1.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> .....	186
Figure 63 : spectre de masse ESI-MS en mode d'ionisation négatif de Sm-DTPA.....	187
Figure 64 : droites d'étalonnage moyennes des complexes a) Sm-DTPA b) Nd DTPA c) Sm-EDTA d) Nd-EDTA. Les barres d'erreur associées à chaque niveau de concentration sont également présentées. ....	191
Figure 65 : droites d'étalonnage moyennes de chaque isotope de lanthanide pour les complexes a) Sm-DTPA b) Nd DTPA c) Sm-EDTA d) Nd-EDTA. Les barres d'erreur associées à chaque niveau de concentration sont également présentées.....	194
Figure 66 : a) diagramme de spéciation de l'échantillon test ; b) distribution des espèces dans l'échantillon test à pH 3,2 .....	198

<i>Figure 67 : distribution des complexes de lanthanides selon le niveau de concentration. NC : non calculé.....</i>	<i>199</i>
<i>Figure 68 : diagramme de répartition des complexes de lanthanides selon le niveau de concentration avec correction du rendement d'ionisation.....</i>	<i>202</i>

# Table des tableaux

Tableau 1 : configurations électroniques des lanthanides en fonction de leur degré d'oxydation (en gras : configuration prédominante, entre parenthèses : configurations instables, en simple : états minoritaires) [8] .....	36
Tableau 2 : rayon ionique des lanthanides +3 (pm) pour un nombre de coordination de 6 [10].....	37
Tableau 3 : constantes de complexation absolues de l'EDTA [15] et du DTPA [16] avec les lanthanides à 25°C et 0,1 de force ionique. ....	40
Tableau 4 : performances analytiques des principaux analyseurs commerciaux [52].....	59
Tableau 5 : spécificités des spectromètres de masse ESI-MS et ICP-MS.....	69
Tableau 6 : bilan des études de l'analyse des agents de contraste à base de gadolinium par différents modes chromatographiques. Les formules des différentes espèces de gadolinium sont présentées en annexe 1. RP-HPLC : chromatographie de partage en phase inverse ; IP-HPLC : chromatographie d'appariement d'ions ; SEC : chromatographie d'exclusion stérique ; LTR : luminescence résolue en temps ; TD-NMR : résonance magnétique nucléaire en temps réel ; SAX-HPLC : chromatographie d'échanges d'anions ; IMAC : chromatographie d'affinité par ions métalliques immobilisés ; TEAA : acétate de triéthylammonium ; TEA : triéthylammonium ; SDS : dodécylsulfate de sodium ; TBA : tributylammonium ; TBA-Br : bromure de tributylammonium ; TFA : acide trifluoroacétique ; CDTA : Acide cyclohexanediamine-1,2-tétraacétique ; Ø : absence de méthodes de quantification ; NS : non spécifié.....	77
Tableau 7 : bilan des études de spéciation des métaux lourds et de transition par HILIC. DMF : diméthyleformamide ; DMSO : diméthylsulfoxyde ; DMA : acide 2'-déoxymuginéique ; NA : nicotianamine ; MA : acide muginéique ; epi-HMA : acide 3-epi-hydroxymuginéique ; EDDHA : acide éthylènediamine-N,N'-bis(o-hydroxyphényl)acétique ; AF : acide formique ; AA : acétate d'ammonium ; FA : formate d'ammonium ; Ø absence de méthode de quantification .....	87
Tableau 8 : bilan des études de spéciation du sélénium par HILIC ; TFA : acide trifluoroacétique ; AA : acétate d'ammonium ; FA : formate d'ammonium .....	92
Tableau 9 : bilan des études de spéciation de l'arsenic par HILIC ; TFA : acide trifluoroacétique ; AA : acétate d'ammonium ; FA : formate d'ammonium .....	94
Tableau 10 : bilan des études de spéciation du gadolinium par HILIC. Les formules des différentes espèces de gadolinium sont présentées en annexe 1.....	99
Tableau 11 : caractéristiques des phases stationnaires sélectionnées pour l'évaluation de la séparation des complexes de lanthanides.....	116
Tableau 12 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS.....	117
Tableau 13 : données chromatographiques obtenues pour la séparation de complexes Ln-DTPA (Nd, Eu, Gd Er), de complexes Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd Er) et de complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Gd,	

Er). Phase mobile : 68/32 (v/v) acétonitrile/eau ; 0,5 % d'acide formique avec différentes concentrations en sels (5, 10 et 20 mol.L <sup>-1</sup> ). Débit = 0,15 mL.min <sup>-1</sup> . V <sub>inj</sub> = 5 µL. Les espèces sont classées par ordre d'élution croissant. * : changement dans l'ordre d'élution. Valeurs de α et Rs sont données dans l'ordre croissant. ND = non déterminé ; NC = non calculable. Les formules appliquées pour le calcul de k, α, Rs et N sont présentées en annexe 3. Les temps de rétention ont été obtenus par extraction des gammes de masse des pics chromatographiques de chaque complexe.....	126
Tableau 14 : données des récupérations de fraction des échantillons de Gd-DTPA avec [Gd] = 1.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> . < LOD = inférieur à la limite de détection de l'ICP-MS.....	128
Tableau 15 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS optimisés pour la phase mobile 70/30 (v/v) acétonitrile/eau et 15 mmol.L <sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium avec un débit de 0,15 mL.min <sup>-1</sup> .....	134
Tableau 16 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS optimisés pour la phase mobile 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L <sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium et 0,5 % d'acide formique avec un débit de 0,3 mL.min <sup>-1</sup> .....	137
Tableau 17 : données chromatographiques de la séparation de complexes Ln-DTPA (Nd, Eu, Gd Er) et de complexes Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd Er) contenus dans un même échantillon. ND = non déterminé ; NC = non calculable. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) ; colonne XBridge (150 x 2,1 mm, 3,5 µm). Les formules appliquées pour le calcul de k, α, Rs et N sont présentées en annexe 3. Les données ont été obtenues par extraction des chromatogrammes des gammes de masse de chaque complexe. ....	138
Tableau 18 : récapitulatif des ions identifiés en ESI-MS en mode d'ionisation négatif lors de la séparation des complexes de lanthanides avec la colonne Acquity. Les gammes de masses en gras correspondent aux espèces majoritaires.....	141
Tableau 19 : isotopes du samarium et du néodyme avec leur abondance isotopique naturelle respective [168].....	148
Tableau 20 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS.....	149
Tableau 21 : récapitulatif des ions identifiés en ESI-MS en mode d'ionisation négatif. Les gammes de masse en gras correspondent aux espèces majoritaires. ....	151
Tableau 22 : Limites de quantification et domaines de linéarité de chaque complexe validés par tests statistiques.....	166
Tableau 23 : Limites de quantification et domaines de linéarité de chaque complexe en intégrant l'ensemble des niveaux de concentration.....	166
Tableau 24 : données expérimentales de stabilité et de justesse de la mesure par HILIC ESI-MS (n = 24) .....	167
Tableau 25: paramètres instrumentaux de l'ESI-MS en injection directe .....	169
Tableau 26 : moyenne des rapports des intensités du complexe Sm-DTPA contenant un isotope particulier du samarium sur celle du complexe <sup>150</sup> Sm-DTPA obtenue par injection directe et par	

<i>HILIC ESI-MS ainsi que les rapports théoriques calculés par le logiciel d'exploitation des spectres de masse et les rapports élémentaires issus de l'IUPAC [168] F : 0,5 s.scan<sup>-1</sup>. DF : 0,25 s.scan<sup>-1</sup>. P : mode profil, C : mode centroïde.....</i>	<i>171</i>
<i>Tableau 27 : répétabilité et justesse de la mesure isotopique du complexe [Sm-DTPA+H]<sup>+</sup> par injection directe et par HILIC ESI-MS. F : 0,5 s.scan<sup>-1</sup>. DF : 0,25 s.scan<sup>-1</sup>. P : mode profil, C : mode centroïde.....</i>	<i>173</i>
<i>Tableau 28 : concentration moyenne en élément entre le début et la fin de chaque pic chromatographique avec <math>m_{inj}</math> la masse d'élément injectée ; <math>m_{espèce}</math> la masse d'élément au sein de chaque espèce ; <math>w</math> la largeur du pic chromatographique ; <math>V_{pic}</math> le volume du pic chromatographique ; <math>C_{post}</math> la concentration de l'élément entre le début et la fin du pic chromatographique.....</i>	<i>182</i>
<i>Tableau 29: paramètres nécessaires pour le dimensionnement du système de couplage.....</i>	<i>183</i>
<i>Tableau 30 : paramètres instrumentaux ESI-MS et ICP-MS en couplage simultané.....</i>	<i>186</i>
<i>Tableau 31 : données chromatographiques de la séparation des complexes Sm-DTPA, Sm-EDTA, Nd-DTPA et Nd-EDTA par HILIC ESI-MS seul et par HILIC ESI-MS avec le système de couplage simultané. Les formules appliquées pour le calcul de <math>R_s</math> et <math>N</math> sont mentionnées en annexe 3. ....</i>	<i>188</i>
<i>Tableau 32 : répétabilité de la mesure des complexes Sm-DTPA, Nd-DTPA, Sm-EDTA et Nd-EDTA .....</i>	<i>192</i>
<i>Tableau 33 : justesse de la mesure des complexes Sm-DTPA, Nd-DTPA, Sm-EDTA et Nd-EDTA .....</i>	<i>192</i>
<i>Tableau 34 : isotopes du samarium et du néodyme analysés avec leurs abondances isotopiques naturelles. En gras les isotopes non interférés. ....</i>	<i>193</i>
<i>Tableau 35 : répétabilité de la mesure de l'échantillon de contrôle de chaque isotope contenu dans les complexes .....</i>	<i>195</i>
<i>Tableau 36 : données de justesse pour chaque réplique et pour chaque isotope contenu dans les complexes.....</i>	<i>196</i>
<i>Tableau 37 : proportions de complexes mesurées par ESI-MS et par ICP-MS par niveau de concentration et proportions moyennes avec l'écart-type ; NC : non calculé.....</i>	<i>199</i>
<i>Tableau 38 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS en injection directe.....</i>	<i>200</i>
<i>Tableau 39 : intensité du signal des complexes de lanthanides .....</i>	<i>201</i>
<i>Tableau 40 : proportions corrigées de complexes analysés par HILIC ESI-MS par niveau de concentration et proportions moyennes avec l'incertitude.....</i>	<i>202</i>
<i>Tableau 41 : distribution moyenne des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS, HILIC ICP-MS ainsi que l'écart-type associé. Distribution théorique issue des simulations par le logiciel PhreeqC .....</i>	<i>203</i>



# Table des équations

Équation 1 : équation générale d'hydrolyse des lanthanides avec $q$ le nombre de lanthanides solvatés, $n$ le nombre de molécules d'eau et $p$ le nombre de ligand hydroxyde ou le nombre de protons libérés.....	38
Équation 2 : réaction de formation a) du complexe Gd-EDTA et b) du complexe Gd-DTPA [14] .....	40
Équation 3 : équation de Knox avec $A, B, C$ des constantes prenant en compte les phénomènes de dispersion intra-colonne. ....	122
Équation 4 : équation relative au mécanisme de partage avec $k_A$ le facteur de rétention hypothétique du composé si la phase mobile est purement organique ; $S$ une constante prenant en compte la polarité du solvant et la taille de l'analyte. ....	132
Équation 5 : équation relative au mécanisme d'adsorption avec $k_B$ le facteur de rétention du composé extrapolé pour une phase mobile purement aqueuse ; $n$ le coefficient stœchiométrique correspondant au nombre de molécules d'eau nécessaires pour déplacer un analyte adsorbé à la surface de la phase stationnaire. ....	132
Équation 6 : équation de transfert de débit optimal avec $D$ les débits, $d_i$ le diamètre interne et $d_p$ le diamètre des particules de chaque colonne.....	136
Équation 7 : calcul de la proportion d'un complexe d'un élément avec $I_{Ln-ligand A}$ l'intensité du complexe de lanthanide à ligand A et $iI_{Ln} - \text{ligand i}$ l'ensemble des complexes d'un même lanthanide, $i$ étant le nombre de ligand.....	164
Équation 8 : calcul de la concentration en Sm-DTPA avec les concentrations en $\text{mol.L}^{-1}$ .....	164
Équation 9 : calcul de la justesse avec $C_{éb}$ la concentration obtenue avec la droite d'étalonnage et $C_{éch}$ , la concentration dans l'échantillon.....	167
Équation 10 : égalité des pertes de charges de chaque partie au niveau du diviseur de flux avec $\Delta p$ (Pa) la perte de charge linéaire dans une tubulure ; $\Lambda$ le coefficient de perte de charge ; $d$ le diamètre du tube, $\rho$ la masse volumique du fluide ( $\text{kg.m}^{-3}$ ), $u$ la vitesse linéaire ( $\text{m.s}^{-1}$ ) et $L$ la longueur du tube (m) .....	180
Équation 11 : relation entre le coefficient de perte de charge $\Lambda$ et le nombre de Reynolds $Re$ avec $\rho$ la masse volumique de la phase mobile, $\eta$ viscosité dynamique de la phase mobile (Pa.s), $u$ la vitesse linéaire ( $\text{m.s}^{-1}$ ) et $d$ le diamètre du tube (m).....	181
Équation 12 : relation en la perte de charge $\Delta p$ , $\eta$ viscosité dynamique de la phase mobile (Pa.s), $u$ la vitesse linéaire ( $\text{m.s}^{-1}$ ), $d$ le diamètre du tube (m) et $L$ la longueur du tube (m).....	181
Équation 13 : relation entre le débit volumique $D$ ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ ) et la vitesse linéaire $u$ ( $\text{m.s}^{-1}$ ) avec $S$ la section du tube ( $\text{m}^2$ ) et $d$ le diamètre du tube.....	181
Équation 14 : relation entre débit de l'ICP-MS et celui de l'ESI-MS, ainsi que la longueur et le diamètre des tubulures et $R$ le rapport de partage .....	181



Équation 15 : calcul de la condition sur les diamètres de tubulures de l'ESI-MS et de l'ICP-MS.....	183
Équation 16 : calcul de la justesse avec $C_{ét}$ la concentration obtenue avec la droite d'étalonnage et $C_{éch}$ la concentration dans l'échantillon.....	192
Équation 17 : proportion de complexe $Ln_A$ -ligand <sub>1</sub> avec $\sum_i \sum_n [Ln_i$ -ligand <sub>n</sub> ] la concentration totale en espèces dans l'échantillon .....	198
Équation 18 : proportion de complexe $Ln_A$ -ligand <sub>1</sub> avec $\alpha$ le facteur de normalisation par rapport au complexe conduisant au signal le moins intense.....	201

## Abréviations et notations

ACN : acétonitrile  
ANOVA : analyse de la variance  
APCI-MS : spectrométrie de masse d'ionisation chimique à pression atmosphérique  
CE : électrophorèse capillaire  
DTPA : acide diéthylènetriaminepentaacétique  
DVB : divinylbenzène  
EDTA : éthylènediaminetétraacétique  
ESI-MS : spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray  
GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse  
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
HILIC : chromatographie d'interaction hydrophile  
IC : chromatographie d'échange d'ions  
ICP-MS : spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif  
ICP-MS-MC : spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif à multicollection  
ICP-OES : spectrométrie d'émission optique à source plasma à couplage inductif  
ICP-SF-MS : spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif à secteur magnétique  
IMAC : la chromatographie d'affinité par ions métalliques immobilisés  
IP-HPLC : chromatographie d'appariement d'ions  
IT : piège à ions  
IUPAC : union internationale de chimie pure et appliquée  
LIT : piège à ions linéaire  
Ln : lanthanide  
LOD : limite de détection  
LOQ : limite de quantification  
 $m/z$  : rapport masse sur charge  
 $m/\Delta m$  : pouvoir de résolution  
MRM (*multiple reaction monitoring*) : suivi de transitions de fragmentation multiples  
MS<sup>2</sup> : spectrométrie de masse en tandem  
MS<sup>n</sup> : spectrométrie de masse à n fragmentations  
NP-HPLC : chromatographie de partage en phase normale  
ppb : partie par milliard  
ppm : partie par million  
ppt : partie par billion  
Q : quadripôle  
QqQ : triple quadripôle  
RP-HPLC : chromatographie de partage en phase inverse  
S/N : rapport signal sur bruit  
SAX-HPLC : chromatographie d'échange d'anions

SEC : la chromatographie d'exclusion stérique  
SIM (*single ion monitoring*) : suivi d'un ion unique  
SRM : (*single reaction monitoring*) : suivi d'une transition de fragmentation  
TD-NMR : résonance magnétique nucléaire à domaine temporel  
TIMS : spectrométrie de masse à thermo-ionisation  
TOF : temps de vol  
TRIS : trishydroxyméthylaminométhane

## **Introduction générale**

En France, l'énergie nucléaire représente 77% de l'énergie électrique produite [1]. Les combustibles nucléaires sont composés initialement d'oxyde d'uranium ou d'un mélange d'oxydes d'uranium et de plutonium. Leur irradiation en réacteur provoque la transformation de l'uranium et du plutonium en de nombreux radioéléments par différentes réactions de fission et de capture neutronique. En fin de vie, le combustible nucléaire contient encore 95 % d'uranium et 1 % de plutonium, considérés comme actinides majeurs. La France a opté pour le traitement du combustible usé selon un cycle fermé afin de recycler la matière valorisable. Ainsi, le combustible nucléaire est traité industriellement par le procédé PUREX (Plutonium and Uranium Refining by EXtraction) pour extraire l'uranium et le plutonium afin qu'ils puissent être de nouveau utilisés dans les centrales nucléaires. Le raffinat du procédé PUREX contient encore de nombreux radioéléments de nature et de propriétés différentes, comme les produits de fission (PF) (Cs, Sr, Zr, lanthanides...) et les actinides dits « mineurs » (américium, curium, neptunium), ces derniers représentant 0,1 % de la masse du combustible usé. Une fois le plutonium récupéré, les actinides mineurs représentent la contribution la plus significative à l'inventaire radiotoxique. L'extraction de ces actinides mineurs des solutions résiduelles de combustibles usés représente donc un enjeu majeur pour réduire la radiotoxicité et le volume des déchets ultimes.

Dans le cadre de la loi de 2006 portant sur la gestion durable des matières et déchets radioactifs [2], des recherches sont dédiées à la séparation sélective des actinides mineurs, afin de les transformer en éléments à durée de vie plus courte par transmutation. Dans cette optique, différents procédés de séparation, basés sur le principe de l'extraction liquide-liquide, ont été développés, optimisés et consolidés pour répondre à différentes stratégies de recyclage (Figure 1).

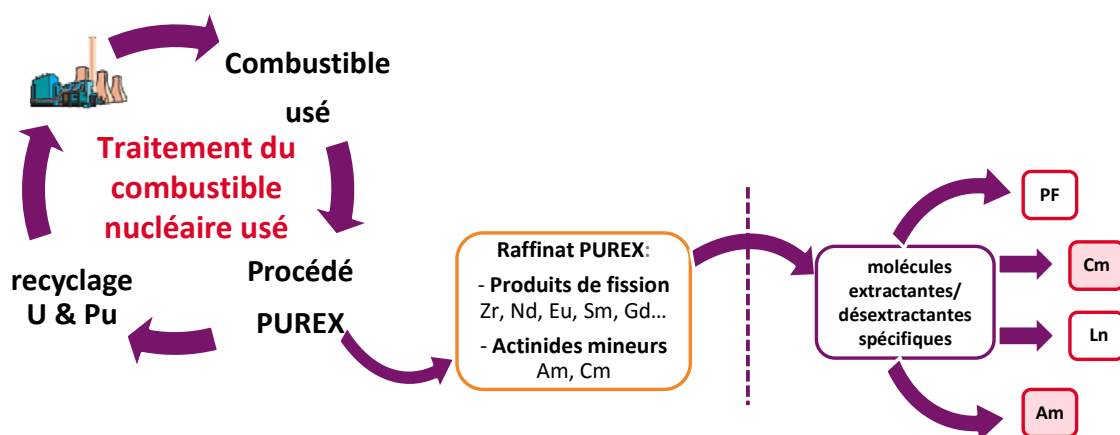


Figure 1 : représentation schématique de la séparation sélective des actinides

Dans l'ensemble des cas, une succession d'opérations d'extraction-lavage et de désextraction est mise en œuvre, impliquant l'emploi de molécules extractantes/désextractantes spécifiques des radioéléments à extraire/désextraire. Si l'objectif final est d'extraire sélectivement l'américium et le curium, voire l'américium seul, des étapes de (dés)extraction des lanthanides ont également lieu au cours de ces différents procédés pour les séparer des actinides mineurs. De nombreux efforts ont d'ailleurs porté ces vingt dernières années, sur la conception de molécules complexantes dédiées à la séparation des actinides et des lanthanides par extraction liquide-liquide [3].

Quel que soit le scénario de séparation envisagé pour la récupération des actinides mineurs, le suivi et le pilotage du procédé mis en œuvre requièrent l'évaluation de ses performances à différentes étapes. L'efficacité d'un procédé est généralement évaluée par la mesure des rendements de récupération et de la pureté des éléments séparés dans les phases organiques et aqueuses. Or, ces éléments sont distribués en de multiples espèces chimiques dans ces phases.

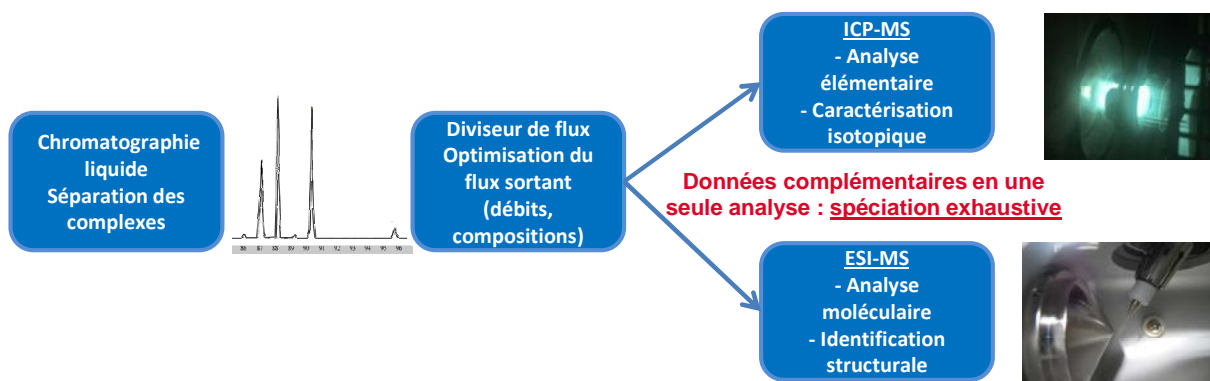
La détermination quantitative de la distribution des actinides et des lanthanides en différentes espèces chimiques à différents points clefs des procédés, c'est-à-dire l'analyse de la spéciation exhaustive des actinides et des lanthanides, est primordiale pour :

- évaluer de façon fine la performance des procédés
- acquérir des données de base permettant d'identifier les principales espèces à considérer lors de la modélisation des procédés.

L'obtention de telles informations est indispensable au dimensionnement des procédés et à l'amélioration de la compréhension des phénomènes et des mécanismes fondamentaux les régissant.

L'objectif de ce travail est de développer *in fine* une méthode d'analyse de spéciation exhaustive des actinides et des lanthanides dans les phases aqueuses de désextraction des procédés de séparation sélective des actinides mineurs. Les matrices de ces procédés étant complexes et les éléments répartis sous différentes formes chimiques, la stratégie adoptée consiste à mettre au point une méthode de séparation par chromatographie des complexes d'actinides et de lanthanides contenant des agents désextractants et le couplage simultané de cette séparation aux spectrométries de masse

à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) (Figure 2).



**Figure 2 : séparation chromatographique couplée simultanément aux spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS)**

Ce développement méthodologique et instrumental permettra d'obtenir en une seule analyse des informations complémentaires, d'une part moléculaires et d'autre part élémentaires et isotopiques sur les espèces préalablement séparées. Les informations moléculaires donneront accès à l'identification et la caractérisation structurale des complexes d'actinides et de lanthanides aidant à l'identification des principales réactions de formation des espèces à considérer lors de la modélisation des procédés. Les analyses isotopiques multi-élémentaires donnent accès à la composition élémentaire et isotopique des actinides et des lanthanides contenus dans les complexes. La concentration des éléments d'intérêt sera donc mesurée, permettant ainsi d'évaluer l'efficacité du procédé, de contrôler la décontamination en lanthanides du flux de production d'actinides et l'élimination de certains produits de fission résiduels. La composition isotopique des actinides et des lanthanides contenus dans les complexes pourra également être déterminée de manière précise en fonction des besoins de qualification du procédé.

La première étape de ce travail de thèse a consisté à dimensionner le couplage simultané en laboratoire conventionnel, pour développer une méthode d'analyse de spéciation avec un système modèle contenant l'ensemble des lanthanides représentatifs complexés, susceptibles d'être présents dans les phases aqueuses des procédés de séparation avancée des actinides mineurs. Les acides polyaminocarboxyliques tels que l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA) et l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) sont utilisés comme agents de désextraction dans de nombreux procédés. Ces complexants spécifiques ont donc été sélectionnés comme ligands constituants des

systèmes modèles, mis conjointement en présence des lanthanides. Les lanthanides étant également des analogues chimiques des actinides, cette similitude sera exploitée pour transposer ces développements analytiques à l'analyse de spéciation des actinides. La technique chromatographique doit permettre la conservation de l'intégrité des espèces au cours de leur séparation et être compatible avec les contraintes spécifiques de chaque instrument, afin d'obtenir des performances analytiques optimales. Le mode de séparation par chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) a été sélectionné pour la réalisation de ces études, dans la mesure où ses caractéristiques sont particulièrement adaptées pour répondre aux conditions précitées.

Ce manuscrit comporte cinq chapitres. Le premier est consacré à une présentation générale des propriétés physico-chimiques des lanthanides, afin de mieux comprendre leurs caractéristiques en solution aqueuse et leur réactivité vis-à-vis de l'EDTA et du DTPA. Les concepts relatifs à l'analyse de spéciation comme les stratégies analytiques susceptibles d'être mises en œuvre, seront aussi présentées dans ce chapitre. Les techniques analytiques et instrumentales utilisées au cours de ce travail seront également décrites.

Le deuxième chapitre présente une étude bibliographique des méthodes chromatographiques développées pour la séparation d'espèces de lanthanides dans diverses matrices. Les méthodes de séparation en mode HILIC pour l'analyse de spéciation sont passées en revue. Les études sur l'application du couplage simultané d'une séparation chromatographique avec les spectrométries de masse ESI-MS et ICP-MS pour la spéciation sont également reportées. De cet état de l'art, il ressort qu'aucune étude ne traite de la séparation en mode HILIC de complexes contenant plusieurs lanthanides, ni du développement d'un couplage simultané d'une technique chromatographique avec l'ICP-MS et l'ESI-MS pour l'analyse de spéciation des lanthanides.

La mise au point de la séparation des complexes de lanthanides (néodyme, europium, gadolinium, erbium) à ligands DTPA et EDTA par HILIC ESI-MS a donc été impérative et fait l'objet du troisième chapitre. Différentes phases stationnaires ont été évaluées afin d'obtenir une sélectivité suffisante permettant la séparation des complexes d'intérêt. Dans la mesure où les mécanismes de rétention en mode HILIC des complexes métalliques sont très peu décrits, une étude des mécanismes de séparation HILIC des complexes de lanthanides a été menée avec la phase stationnaire la plus performante.



Des conditions d'analyse plus rapides ont été initiées afin de réduire les temps de manipulation, paramètres déterminants pour l'analyse de futurs échantillons radioactifs.

Le quatrième chapitre est dédié au développement d'une méthode préliminaire de quantification par étalonnage classique de complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS. Pour cette mise au point, le système d'étude sélectionné contient du samarium et du néodyme en présence d'EDTA et de DTPA. Les performances analytiques, à savoir les limites de détection et de quantification ainsi que le domaine de linéarité, la stabilité et les justesses de mesure, ont été déterminées. Le potentiel d'utilisation de l'ESI-MS pour la caractérisation isotopique a également été évalué en vue du développement futur des approches de type dilution isotopique.

Le cinquième chapitre présente la mise au point du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC aux spectrométries de masse ESI-MS et ICP-MS. Une méthode préliminaire de quantification en parallèle par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS a été ensuite développée. Outre les performances analytiques obtenues avec chaque instrument, la distribution quantitative des éléments dans l'échantillon a été déterminée par ESI-MS et ICP-MS.

Les perspectives relatives à ces travaux sont présentées à la suite de la conclusion.

# **Chapitre I**

## **Généralités**

Ce chapitre présente les principaux concepts et techniques instrumentales pour aborder l'étude de la spéciation des lanthanides. La première partie est consacrée aux définitions et rappels concernant, dans un premier temps, les propriétés physico-chimiques et de coordination des lanthanides. Ces éléments présentent en effet des propriétés très proches, qui rendent leur séparation délicate. Dans un second temps, la définition de la spéciation et ses domaines d'applications sont présentés. Déterminer la spéciation d'un élément dépend de nombreux paramètres ; ainsi différentes stratégies susceptibles d'être mises en place lors du développement d'une méthode d'analyse de spéciation sont abordées. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à la description des techniques analytiques que nous avons mises en œuvre pour l'étude de la spéciation des lanthanides dans des échantillons représentatifs de phases aqueuses de désextraction, issues des procédés de traitement du combustible nucléaire usé. Les principes de la méthode de séparation par chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC), mode de séparation sélectionné pour la séparation de nos composés d'intérêt, sont décrits ainsi que ses principaux avantages, notamment pour l'analyse de spéciation. La chromatographie en mode HILIC sera couplée aux spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS). Les caractéristiques de ces techniques sont présentées ainsi que leurs principaux avantages et limites dans le cadre de l'analyse de spéciation.

## **1 Définitions et rappels**

### ***1-a) Propriétés physico-chimiques et de coordination des lanthanides***

Le série des lanthanides est constituée de 15 éléments chimiques dont le numéro atomique est compris entre 57 (le lanthane, La) et 71 (le lutécium, Lu) (Figure 3).

57 138.91	58 140.12	59 140.91	60 144.24	61 (145)	62 150.36	63 151.96	64 157.25	65 158.93	66 162.50	67 164.93	68 167.26	69 168.93	70 173.05	71 174.97
<b>La</b>	<b>Ce</b>	<b>Pr</b>	<b>Nd</b>	<b>Pm</b>	<b>Sm</b>	<b>Eu</b>	<b>Gd</b>	<b>Tb</b>	<b>Dy</b>	<b>Ho</b>	<b>Er</b>	<b>Tm</b>	<b>Yb</b>	<b>Lu</b>
LANTHANE	CÉRIUM	PRASEODYME	NÉODYME	PROMÉTHIUM	SAMARIUM	EUROPIUM	GADOLINIUM	TERBIUM	DYSPROSIUM	HOLMIUM	ERBIUM	THULIUM	YTTERBIUM	LUTÉTIUM

**Figure 3 : séries des lanthanides**

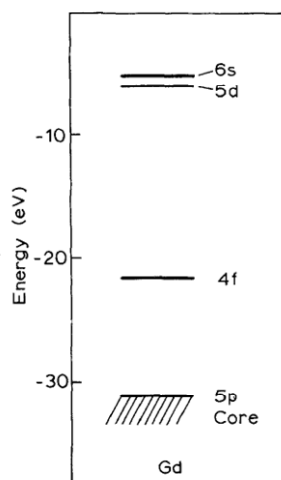
Découverts au cours du XVIII<sup>ème</sup> siècle, leur séparation est très délicate en raison de leur propriétés physico-chimiques très proches [4]. La connaissance des propriétés physico-chimiques des lanthanides est fondamentale pour développer des méthodes permettant leur séparation, que ce soit lors de la conception de molécules extractantes/désextractantes spécifiques pour le traitement du combustible nucléaire

usé, pour le développement de méthodes d'analyses de leur spéciation dans différentes phases issues des procédés de traitement du combustible ou encore dans divers domaines comme la géochimie etc.

### 1-a-1) Configuration électronique et états d'oxydation

#### ➤ Configuration électronique

Les lanthanides sont des éléments de la 6<sup>ème</sup> période de la classification périodique. Ils sont caractérisés par une sous couche  $4f$  partiellement remplie, blindée par les couches externes  $5s^2 5p^6$  [5] (Figure 4).



**Figure 4 : niveaux d'énergie des électrons de valence du gadolinium (adapté de [6])**

La configuration électronique du lanthane est  $[\text{Xe}] 4f^0 5d^1 6s^2$ , celle du cérium  $[\text{Xe}] 4f^1 5d^1 6s^2$ . Ensuite le remplissage de la sous couche  $4f$  est progressif du praséodyme,  $[\text{Xe}] 4f^3 5d^0 6s^2$ , à l'ytterbium,  $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^0 6s^2$ . Enfin la configuration du lutécium est  $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^1 6s^2$ . Le gadolinium présente une configuration électronique particulière,  $[\text{Xe}] 4f^7 5d^1 6s^2$ , en raison de l'effet de stabilisation de la sous couche  $4f$  à demi remplie. La configuration électronique de la sous couche  $f$  similaire entre le gadolinium et l'euporium ( $[\text{Xe}] 4f^7 5d^0 6s^2$ ) peut engendrer des difficultés lors de leur séparation.

#### ➤ États d'oxydation

Le degré d'oxydation prédominant des lanthanides est +3 en particulier en milieux aqueux. La configuration électronique des ions  $\text{Ln}^{3+}$  est donnée dans le Tableau 1. La sous couche  $4f$  est formée d'orbitales plus basses en énergie (orbitales de cœur) que celles des couches  $6s$  et  $5d$  (Figure 4). Le degré d'oxydation +3 résulte donc de la perte des électrons des couches externes  $6s$  et  $5d$  [7].

Élément	état d'oxydation		
	Ln <sup>2+</sup>	Ln <sup>3+</sup>	Ln <sup>4+</sup>
Lanthane (La)		<b>[Xe] 4f<sup>0</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Cérium (Ce)		<b>[Xe] 4f<sup>1</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	[Xe] 4f <sup>0</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup>
Praséodyme (Pr)	([Xe] 4f <sup>3</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup> )	<b>[Xe] 4f<sup>2</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	[Xe] 4f <sup>1</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup>
Néodyme (Nd)	([Xe] 4f <sup>4</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup> )	<b>[Xe] 4f<sup>3</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Prométhium (Pm)	([Xe] 4f <sup>5</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup> )	<b>[Xe] 4f<sup>4</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Samarium (Sm)	[Xe] 4f <sup>6</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup>	<b>[Xe] 4f<sup>5</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Europium (Eu)	[Xe] 4f <sup>7</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup>	<b>[Xe] 4f<sup>6</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Gadolinium (Gd)		<b>[Xe] 4f<sup>7</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Terbium (Tb)		<b>[Xe] 4f<sup>8</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	[Xe] 4f <sup>7</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup>
Dysprosium (Dy)	([Xe] 4f <sup>10</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup> )	<b>[Xe] 4f<sup>9</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	([Xe] 4f <sup>8</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup> )
Holmium (Ho)	([Xe] 4f <sup>11</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup> )	<b>[Xe] 4f<sup>10</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Erbium (Er)		<b>[Xe] 4f<sup>11</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Thulium (Tm)	([Xe] 4f <sup>13</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup> )	<b>[Xe] 4f<sup>12</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Ytterbium (Yb)	[Xe] 4f <sup>14</sup> 5d <sup>0</sup> 6s <sup>0</sup>	<b>[Xe] 4f<sup>13</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	
Lutétium (Lu)		<b>[Xe] 4f<sup>14</sup> 5d<sup>0</sup> 6s<sup>0</sup></b>	

**Tableau 1 : configurations électroniques des lanthanides en fonction de leur degré d'oxydation (en gras : configuration prédominante, entre parenthèses : configurations instables, en simple : états minoritaires) [8]**

Les configurations instables +2 ou +4 sont essentiellement observées à l'état solide [9], alors qu'en solution aqueuse, seul l'état d'oxydation +3 est stable (Tableau 1). Ceci s'explique par le fait que :

- d'une part, le potentiel standard des couples Ln<sup>3+</sup>/Ln<sup>2+</sup> est négatif engendrant la réduction de l'eau en dihydrogène dont le potentiel standard du couple est de 0 V [9] ;

- d'autre part, les lanthanides aux degrés d'oxydation +4 sont de puissants oxydants avec des potentiels standards supérieurs à 1,23 V, provoquant une oxydation de l'eau en oxygène dont le potentiel standard est de 1,23 V [9].

D'autres états d'oxydation +2 ou +4 peuvent être rencontrés en solution aqueuse lorsque les énergies des couches 5d et 4f sont proches (Eu<sup>2+</sup>, Sm<sup>2+</sup>, Yb<sup>2+</sup>, Ce<sup>4+</sup>, Pr<sup>4+</sup>, Tb<sup>4+</sup>) mais ils restent minoritaires [9]. L'homogénéité des degrés d'oxydation des lanthanides en solution contribue à la similitude de leurs propriétés physico-chimiques et donc de leur séparation délicate.

### 1-a-1) Rayon ionique

Les complexes de lanthanides en solution présentent des nombres de coordination variés (4 à 12). Le nombre de coordination est influencé par un certain nombre de paramètres comme l'encombrement stérique ou les répulsions électrostatiques entre les ligands coordonnés aux lanthanides, mais aussi par le rayon ionique des lanthanides.

Le rayon ionique des lanthanides diminue lorsque leur numéro atomique augmente le long de la série. Cette décroissance, appelée contraction des lanthanides [10],

s'explique par l'augmentation de l'attraction coulombienne des électrons par le noyau, lorsque le champ électrique nucléaire augmente, afin de stabiliser les orbitales *f*. La densité de charge des lanthanides de numéro atomique élevé est donc plus importante que pour les lanthanides de faible numéro atomique. Elle augmente donc le long de la série des lanthanides. À titre d'exemple, le Tableau 2 présente le rayon ionique des lanthanides pour un nombre de coordination de 6.

La <sup>3+</sup>	Ce <sup>3+</sup>	Pr <sup>3+</sup>	Nd <sup>3+</sup>	Pm <sup>3+</sup>	Sm <sup>3+</sup>	Eu <sup>3+</sup>	Gd <sup>3+</sup>	Tb <sup>3+</sup>	Dy <sup>3+</sup>	Ho <sup>3+</sup>	Er <sup>3+</sup>	Tm <sup>3+</sup>	Yb <sup>3+</sup>	Lu <sup>3+</sup>
103,2	101	99	98,3	97	95,8	94,7	93,8	92,3	91,2	90,1	89	88	86,8	86,1

**Tableau 2 : rayon ionique des lanthanides +3 (pm) pour un nombre de coordination de 6 [10]**

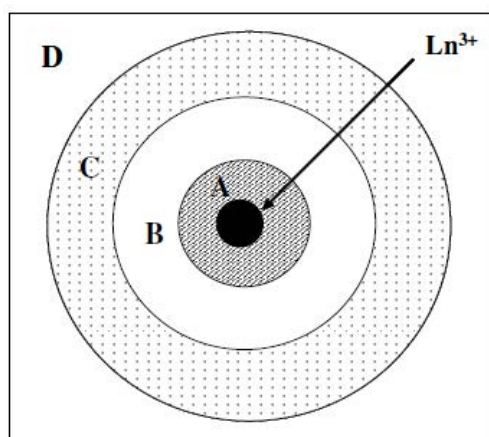
Contrairement au degré d'oxydation, le rayon ionique peut permettre de discriminer les lanthanides entre eux. Des différences de comportement vis-à-vis de ligands organiques sont donc attendues et vont permettre d'envisager leur séparation.

#### 1-a-2) Hydratation et hydrolyse des lanthanides

En solution aqueuse, les lanthanides sont solvatés et peuvent également réagir avec l'eau selon une réaction d'hydrolyse.

##### ➤ **Hydratation**

La solvation des ions lanthanides par l'eau peut être décrite par un modèle sphérique délimité en quatre zones (Figure 5) [11]. La zone A est appelée première sphère de coordination ou sphère interne de solvation. Elle correspond à la zone où les molécules d'eau sont directement liées au cation par liaison ionique. La zone B est la sphère externe de solvation où les molécules d'eau ne sont pas directement liées aux lanthanides mais sont fortement influencées par le champ électrostatique généré par le cation. Le nombre de molécules d'eau dans cette zone dépend donc de la densité de charge du cation. La zone C est une zone moins ordonnée que la zone B où les molécules d'eau subissent une influence faible du cation. La dernière zone correspond à la zone D, où le cation n'a aucune influence sur les molécules d'eau.

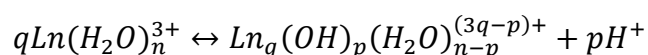


**Figure 5 : sphère d'hydratation d'un cation lanthanide. Zone A : sphère interne de solvation. Zone B : sphère externe de solvation. Zone C : zone désordonnée. Zone D : zone non influencée [11]**

La sphère d'hydratation des ions  $\text{Ln}^{3+}$  n'est pas constante le long de la série. Les lanthanides les plus légers et de rayons ioniques les plus élevés (La-Eu) ont un nombre de molécules d'eau dans la sphère interne de solvation de l'ordre de 9. Les plus lourds et de rayons ioniques les moins élevés, quant à eux, ont un nombre de molécules d'eau de l'ordre de 8 (Dy-Lu). Les lanthanides intermédiaires, Gd et Tb, ont un nombre de molécules d'eau entre 8 et 9 [12].

### ➤ Hydrolyse

Lorsqu'un ion lanthanide est hydraté, les molécules d'eau de la sphère interne d'hydratation peuvent se comporter comme des acides et libérer un proton pour former des ligands hydroxyde, selon une réaction d'hydrolyse (Équation 1)



**Équation 1 : équation générale d'hydrolyse des lanthanides avec q le nombre de lanthanides solvatés, n le nombre de molécules d'eau et p le nombre de ligand hydroxyde ou le nombre de protons libérés**

Ces réactions sont dépendantes du pH ainsi que des concentrations en lanthanides. Pour un lanthanide ( $q=1$ ), la première étape d'hydrolyse ( $p=1$ ) se produit généralement à des pH supérieurs à 6 et pour des concentrations en lanthanide de l'ordre de  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  [11]. Pour des concentrations inférieures à  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , le pH de première hydrolyse est supérieur à pH 6. Dans notre étude, le pH de nos échantillons est de 3,2 et la concentration maximale en lanthanide dans les solutions mères de l'ordre de  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Les réactions d'hydrolyse des lanthanides ne sont donc pas supposées se produire dans ces conditions.

### 1-a-3) Propriétés de coordination des lanthanides

La réactivité des lanthanides suit la théorie HSAB (*Hard/Soft Acids and Bases*) développée par Pearson en 1963 [13]. Cette théorie permet de classer les acides et les bases au sens de Lewis en deux catégories :

- les acides durs, de faible rayon ionique avec un état d'oxydation élevé et les bases dures, avec un excès d'électrons. Les acides et les bases durs sont faiblement polarisables ;

- les acides mous, de rayon ionique plus élevé avec un état d'oxydation faible, et les bases molles, avec un déficit d'électrons. Les acides et les bases mous sont fortement polarisables ;

Pearson énonce alors que « les acides durs réagissent préférentiellement avec les bases dures et les acides mous avec les bases molles » [13]. Les liaisons entre les espèces ayant une grande dureté sont de nature ionique, tandis que les espèces dites molles forment des liaisons covalentes.

Les électrons de valence des cations  $\text{Ln}^{3+}$  se trouvant dans les orbitales de cœur  $4f$ , sont très peu sensibles à l'environnement chimique et ne sont donc généralement pas impliqués dans la formation de liaisons covalentes. Les lanthanides sont des acides durs et vont former préférentiellement des liaisons ioniques avec des bases dures. Les bases dures sont des espèces avec des atomes donneurs et sont composées généralement de fonctions oxygénées et azotées. Comme indiqué précédemment, les lanthanides présentent un rayon ionique décroissant avec leur numéro atomique et la dureté des lanthanides augmentent avec le long de la série des lanthanides en raison de l'augmentation de la densité de charge. Les interactions électrostatiques entre ligands et les cations  $\text{Ln}^{3+}$  sont donc plus élevées pour les lanthanides lourds que pour les lanthanides légers. Ainsi la réactivité vis-à-vis des bases dures diffère selon les lanthanides. Cette légère différence de réactivité est exploitée pour séparer les lanthanides dans les procédés de traitement du combustible usé

### ➤ Coordination des lanthanides avec les ligands polyaminocarboxyliques

Les ligands polyaminocarboxyliques sont utilisés dans de nombreux domaines comme en médecine, en tant qu'agent de décontamination ou dans les procédés de traitement du combustible usé comme complexants spécifiques. Dans ce travail, deux ligands polyaminocarboxyliques utilisés comme des agents désextractants des procédés





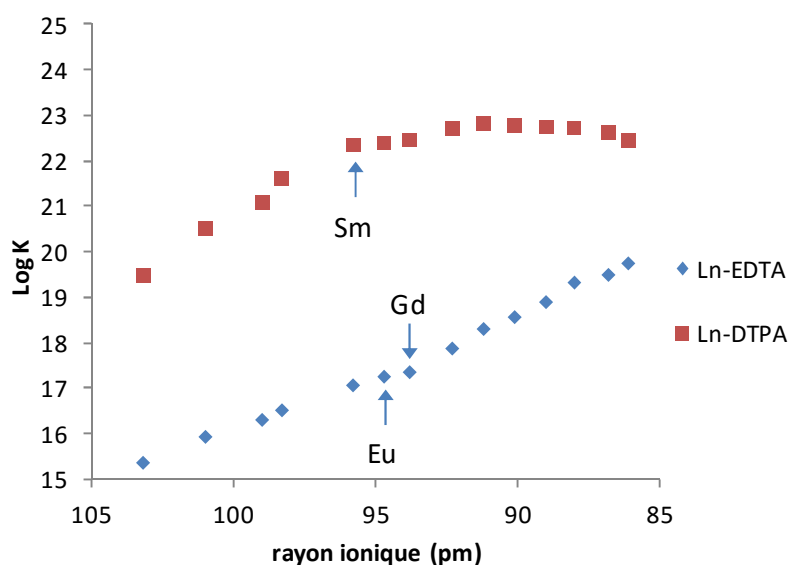
...de f... ..



Les constantes de formation de ces complexes sont comprises à 15 (Tableau 3). Il

ntes de complexation absolues de l'EDTA [15] e

L'évolution des valeurs des constantes de complexation des lanthanides avec l'EDTA suit de manière uniforme l'évaluation de dureté des lanthanides, à savoir que la stabilité augmente le long de la série des lanthanides. Cette augmentation est de 4 ordres de grandeur (Tableau 3). En revanche, les valeurs des constantes de complexation des lanthanides avec le DTPA n'augmentent pas de manière uniforme. Ces valeurs augmentent pour atteindre un plateau à partir du samarium, ce qui reflète probablement une contrainte stérique plus importante pour les cations  $\text{Ln}^{3+}$  de plus petits rayons ioniques. Cette différence de comportement est illustrée en Figure 7 :



**Figure 7 : évolution des constantes de complexation absolues des complexes Ln-EDTA (en bleu) et Ln-DTPA (en rouge) en fonction du rayon ionique (échelle décroissante) ; données issues des tableaux 1 et 3 [10,15,16]**

Les valeurs des  $\log(K_{\text{Ln-EDTA}})$  augmentent avec la diminution du rayon ionique. Un point d'inflexion est néanmoins observé au niveau du gadolinium susceptible d'être attribué au changement de la sphère d'hydratation de l'ion  $\text{Gd}^{3+}$ .

*Les lanthanides sont majoritairement présents au degré d'oxydation +3 en solution aqueuse. Les phases aqueuses des procédés de traitement du combustible sont en milieu acide avec un pH entre 3 et 4. Ces phases sont composées de cations  $\text{Ln}^{3+}$  coordonnés à des agents (dés)extractants spécifiques. Cette homogénéité d'état d'oxydation contribue à rendre leur séparation délicate. Cependant une contraction du rayon ionique est observée le long de la série des lanthanides. Les légères différences des rayons ioniques peuvent induire des réactivités différentes des cations  $\text{Ln}^{3+}$  vis-à-vis des ligands. Ces différences de réactivité sont à la base de l'élaboration de molécules extractantes ou désextractantes spécifiques des lanthanides pour les procédés de retraitement du combustible nucléaire usé ou sont exploitées pour les séparations chromatographiques. Les lanthanides sont des acides durs et réagissent préférentiellement avec les bases dures. Deux ligands polyaminocarboxyliques composés de fonctions avec un excès d'électrons, l'EDTA et le DTPA, utilisés comme agents désextractantes sont considérés dans notre travail. Ces ligands présentent des constantes de complexation différentes en raison de la différence de dureté des lanthanides. Ceci laisse présager des possibilités de séparation des complexes de lanthanides.*

## **1-b) La spéciation**

### **1-b-1) Définitions et domaines d'application**

D'après la définition de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), la spéciation d'un élément désigne sa distribution sous différentes espèces chimiques définies dans un système [17]. Une espèce chimique est définie par la forme spécifique d'un élément, caractérisée par sa composition isotopique, son état d'oxydation ou sa configuration électronique et/ou sa structure complexe ou moléculaire [17].

La spéciation d'un élément gouverne les mécanismes mis en jeu dans sa biodisponibilité, son transport, son accumulation, sa réactivité et sa toxicité. Par conséquent, la connaissance des espèces sous lesquelles se trouve un élément dans un milieu permet une meilleure compréhension des processus dans lesquels cet élément est impliqué. L'analyse de spéciation a été mise en œuvre dans de nombreux domaines pour étudier l'impact de polluants anthropogéniques sur le vivant et l'environnement, pour déterminer les métabolites d'agents thérapeutiques contenant des métaux ou des métalloïdes dans l'industrie pharmaceutique, pour déterminer les formes toxiques d'un élément dans le milieu médical, mais aussi pour appréhender la forme biodisponible

d'un élément essentiel dans l'industrie alimentaire [18-22]. Ces études de spéciation apportent un soutien à la conception d'agents de décapsulation/remédiation, thérapeutiques ou de diagnostic plus efficaces et sélectifs. Dans le domaine du nucléaire, l'analyse de spéciation des actinides et des lanthanides intervient à différentes étapes du cycle du combustible :

- au niveau de la conception de molécules (dés)extractantes efficaces et sélectives, utilisées de l'amont à l'aval du cycle ;
- au niveau de l'amélioration des procédés de traitement du combustible à travers l'évaluation de leurs performances et l'acquisition de données de base permettant d'identifier les principales espèces à considérer lors de la modélisation des procédés ;
- pour une meilleure compréhension du comportement et de la migration des radionucléides en conditions de stockage et dans l'environnement.

Déterminer la spéciation d'un ou de plusieurs éléments dans un échantillon nécessite l'utilisation et le développement de méthodes analytiques pour détecter, localiser, caractériser et quantifier les différentes espèces chimiques sous lesquelles cet élément se trouve.

#### 1-b-2) Stratégies mises en œuvre en analyse de spéciation

Les stratégies analytiques à mettre en œuvre pour définir la spéciation d'un élément vont dépendre de nombreux paramètres tels que la nature de l'échantillon, la concentration des analytes d'intérêt, la nature des ligands coordonnés, la matrice dans laquelle ils se trouvent etc... D'autres critères sont également à considérer, tels que l'obtention d'une réponse sensible et spécifique tout en conservant l'intégrité de l'échantillon en termes de concentration et de structure des espèces.

La plupart des matrices rencontrées dans les domaines de l'analyse de spéciation, telles que celles des procédés de traitement du combustible nucléaire usé, sont très complexes avec des éléments répartis sous de multiples formes chimiques et en concentrations variables. Le développement du couplage de techniques séparatives avec une détection sensible et spécifique est alors incontournable pour séparer, caractériser et quantifier des espèces chimiques d'intérêt avec des limites de détection les plus faibles possibles. Concernant les techniques chromatographiques, de nombreux modes de séparation existent donnant lieu à des sélectivités très diverses. La sélection de la technique séparative la plus adéquate dépend de la nature des espèces à séparer, de la matrice de l'échantillon, de l'information à atteindre et de la compatibilité de

l'instrument de détection avec le type de séparation mis en œuvre. L'étude préalable de systèmes modèles s'avère par conséquent essentielle pour développer des méthodes séparatives couplées dédiées à l'analyse de spéciation dans des milieux réels complexes. Cette démarche est importante à plusieurs titres. Tout d'abord, les développements chromatographiques concernant la séparation de complexes métalliques sont relativement restreints comparativement aux composés organiques pour lesquels des méthodes séparatives aussi nombreuses que variées sont décrites dans la littérature. Ensuite l'analyse d'échantillons radioactifs, dont la mise en œuvre est délicate, impose une manipulation spécifique des échantillons et l'utilisation de chaînes chromatographiques et d'instruments installés en boîtes à gants.

Dans le cadre de ce travail, le développement d'une méthode d'analyse de spéciation exhaustive des lanthanides requiert une technique séparative chromatographique adaptée à la séparation des complexes de lanthanides, couplée à des techniques de détection sensibles et spécifiques. L'objectif est de pouvoir effectuer l'identification, la caractérisation structurale, la détermination des compositions élémentaires et isotopiques ainsi que la quantification des espèces préalablement séparées.

## **2 Techniques analytiques considérées pour l'étude de spéciation des lanthanides**

Afin de déterminer, en une seule analyse, la spéciation exhaustive des lanthanides dans les phases aqueuses de désextraction des procédés de traitement du combustible usé, la stratégie analytique adoptée a été de coupler la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC), simultanément à la spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à la spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS). La description de ces techniques analytiques fait l'objet de cette partie. La chromatographie d'interaction hydrophile, qui présente de nombreux avantages pour être appliquée à la séparation de complexes de lanthanides est, dans un premier temps, décrite. Les spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray et à source plasma à couplage inductif sont présentées dans un deuxième temps ainsi que les informations spécifiques apportées par chaque instrument, leurs avantages et leurs limites.

## 2-a) La chromatographie d'interaction hydrophile HILIC

La chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*) a été introduite par Alpert en 1990 [23]. Il s'agit d'un mode chromatographique combinant une phase stationnaire polaire, comme en chromatographie de partage en phase normale (NP-HPLC) (annexe 2) et une phase mobile hydro-organique, comme en chromatographie de partage en phase inverse (RP-HPLC) (annexe 2). Ce mode chromatographique est adapté à la séparation de composés polaires, hydrophiles, neutres mais également aux analytes chargés comme en chromatographie d'échange d'ions (IC, *ion exchange chromatography*) (annexe 2). L'HILIC combine donc un ensemble de caractéristiques communes à divers modes chromatographiques comme présenté dans la Figure 8.

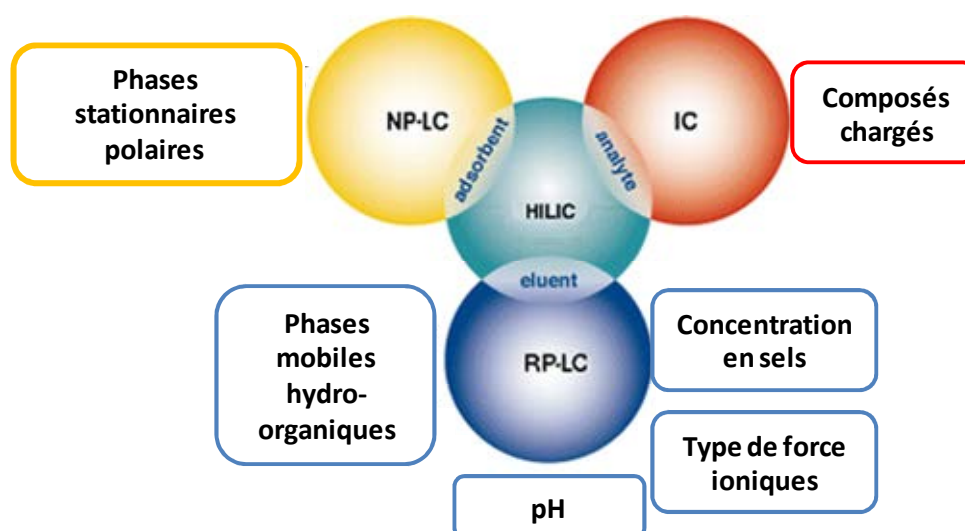
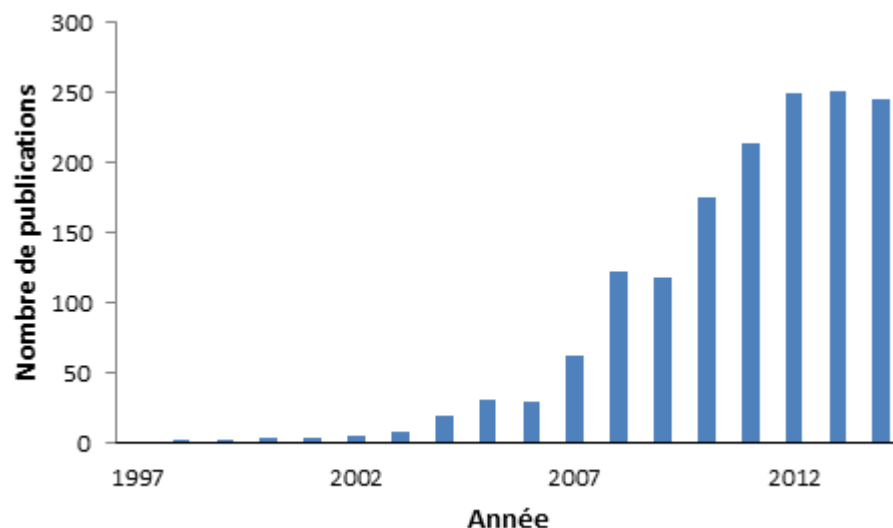


Figure 8 : l'HILIC, combinaison des caractéristiques de la RP-HPLC, la NP-HPLC et l'IC (adapté de [24]).

Le besoin permanent de méthodes chromatographiques adaptées à l'analyse de composés polaires a contribué au développement de l'HILIC. Cette technique a par conséquent connu un essor considérable depuis les années 2000 comme le montre la Figure 9 où moins de 20 publications sur l'HILIC étaient référencées en 2004 contre plus de 240 en 2014.



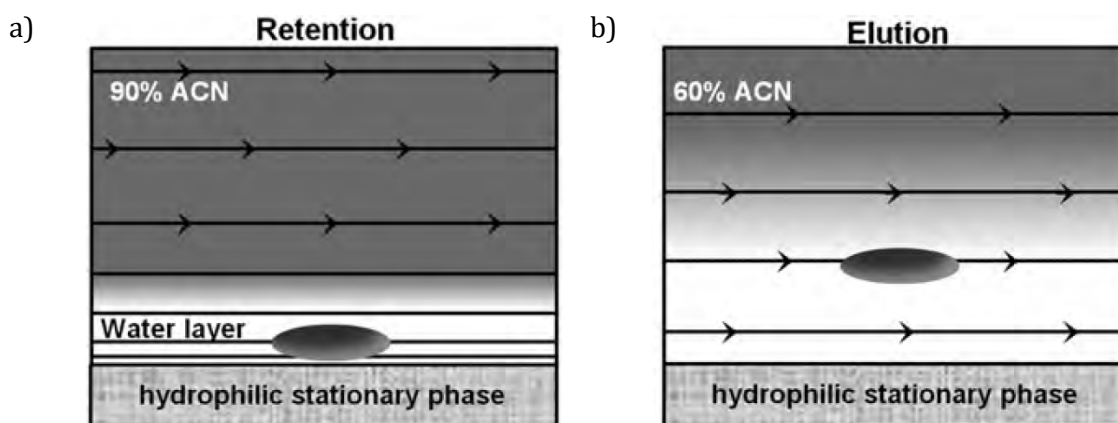
**Figure 9 : évolution du nombre de publications sur l'HILIC d'après web of Science**

Par conséquent la chromatographie en mode HILIC permet l'analyse de composés hydrophiles et chargés qui sont peu retenus ou élués dans le volume mort en RP-HPLC en raison de l'utilisation de phases stationnaires à fonctions hydrophobes (C8, C18, DVB...) [25]. Ces mêmes composés ne peuvent pas être séparés en NP-HPLC du fait de leur insolubilité dans les phases mobiles utilisées dans ce mode chromatographique (hexane, chloroforme...) [25]. De plus, l'HILIC permet des séparations avec moins d'effet d'élargissement des pics chromatographiques qu'en NP-HPLC, grâce à l'utilisation de sels solubles dans les phases hydro-organiques [24]. Ainsi, durant ces dernières années, l'HILIC s'est imposée comme une méthode alternative pour l'analyse de divers composés hydrophiles, polaires ou chargés dans de nombreux domaines comme en pharmacocinétique, en protéomique, dans l'industrie alimentaire etc... [25].

#### 2-a-1) Mécanismes de rétention

Le mécanisme de rétention HILIC est très complexe et fait encore l'objet de nombreuses études. En effet, les phases stationnaires utilisées en HILIC sont plus polaires que la phase mobile. Cette caractéristique est à l'origine de la formation d'une couche enrichie en eau à la surface de la phase stationnaire. Cette couche d'eau partiellement immobilisée fait partie intégrante de la phase stationnaire. C'est pourquoi le mécanisme primaire de rétention en HILIC est un mécanisme de partage du soluté entre la phase mobile et la couche d'eau, adsorbée à la surface de la phase mobile. L'augmentation de la force éluante de la phase stationnaire, à savoir l'augmentation de la proportion d'eau, va permettre l'élution des composés par ordre de polarité

croissante (Figure 10). Les composés polaires sont donc plus retenus que les composés moins polaires contrairement à la RP-HPLC où l'ordre d'élution inverse est observé.



**Figure 10 : comportement général d'un composé polaire en HILIC : a) rétention à haut pourcentage d'acétonitrile b) élution lorsque que la force éluante de la phase mobile augmente [26]**

Le pourcentage d'eau dans la phase mobile varie entre 5 et 40 % avec un minimum nécessaire de 2% pour former la couche superficielle enrichie en eau [27].

Le mécanisme de partage ne suffit néanmoins pas à expliquer à lui seul la rétention de certains composés. Des mécanismes secondaires impliquant des interactions soluté-phase stationnaire peuvent avoir lieu comme un mécanisme d'adsorption ou comme des interactions électrostatiques, hydrophobes ou des liaisons hydrogène [24,25,27,28]. Le mode de rétention HILIC résulte ainsi de la combinaison du mécanisme de partage primaire et des mécanismes secondaires résultant des interactions entre la phase stationnaire et les analytes. De nombreux paramètres chromatographiques sont donc à prendre en compte lors du développement d'une méthode chromatographique en HILIC, notamment le type de phase stationnaire, la proportion de solvant organique, la nature et la concentration en sels, le pH de la phase mobile ainsi que sa température.

#### 2-a-2) Phases stationnaires

Le type de phase stationnaire est le premier paramètre important à considérer. L'ensemble des phases stationnaires polaires peut être utilisé en HILIC. Dans un premier temps, les phases stationnaires habituellement utilisées en NP-HPLC ont été initialement employées (silice vierge, phases stationnaire à greffons amine) [27]. Devant l'intérêt croissant pour l'analyse de composés polaires, de nombreuses phases spécifiques à l'HILIC ont été développées telles que les phases stationnaires fonctionnalisées par des groupements zwitterionique, amide, diol réticulé... utilisées dans de nombreuses



applications [24,26,27]. Des phases stationnaires ont également été développées pour des applications spécifiques comme les phases stationnaires à groupements glucidiques pour l'analyse d'oligosaccharides ou pour des séparations chirales [27].

Les phases stationnaires peuvent être classées selon la fonctionnalisation et de la charge des groupements de la phase stationnaire :

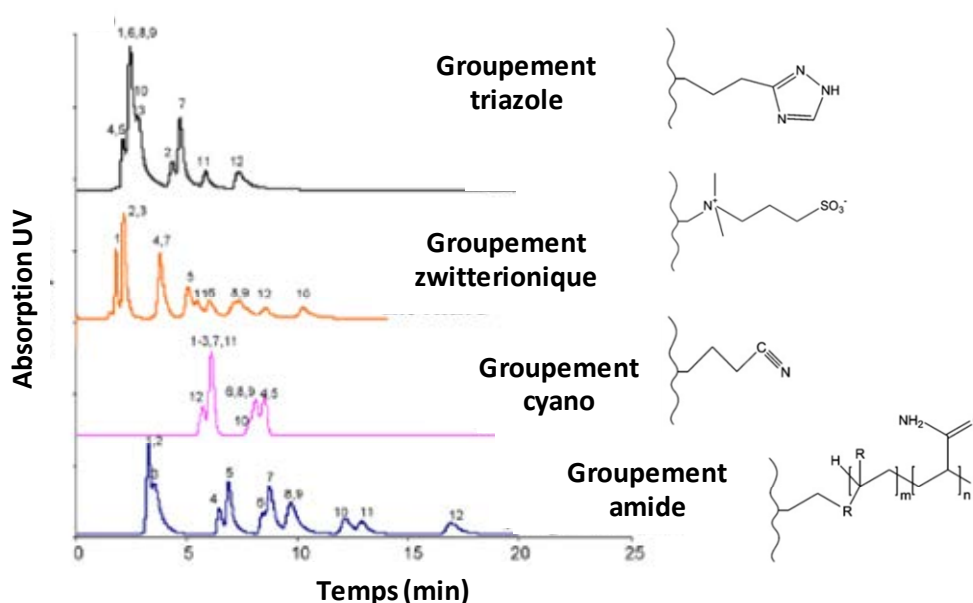
- **Non fonctionnalisées** : silice vierge dont la charge dépend du pH en raison de la présence de silanols résiduels à la surface de la phase stationnaire.

- **Fonctionnalisées par des groupements neutres** : diol, amide, cyano,... où peu d'interactions ioniques entre la phase stationnaire et le soluté sont présentes, mais plutôt des interactions de type liaisons hydrogène.

- **Fonctionnalisées par des groupements ionisés/ionisables** : triazole, sulfate, amine primaire et quaternaire... engendrant des interactions électrostatiques fortes entre la phase stationnaire et le soluté chargé, nécessitant l'utilisation de sels dans la phase mobile et dont la charge dépend du pH.

- **Fonctionnalisées par des groupements zwitterioniques** : phosphorylcholine, sulfobetaine... présentant une charge positive et une charge négative mais globalement neutre quel que soit le pH et engendrant des interactions électrostatiques faibles entre la phase stationnaire et l'analyte.

Selon le groupement fonctionnel de la phase stationnaire, des sélectivités différentes sont attendues. La Figure 11 illustre les sélectivités de différents types de phases stationnaires pour la séparation de neurotransmetteurs, dans les mêmes conditions de phase mobile.



**Figure 11 : séparation de neurotransmetteurs dans les mêmes conditions de phase mobile, avec différents types de phases stationnaires. Phase mobile : 80/20 acétonitrile/eau (v/v), [acétate d'ammonium] = 20 mM, pH 3 [29]**

La différence de sélectivité observée entre les phases stationnaires utilisées, dans les mêmes conditions de phases mobiles, met en évidence l'existence d'interactions soluté-phase stationnaire très variées. Ainsi le choix *a priori* d'une phase stationnaire appropriée pour la séparation de composés donnés est délicate. Des classifications de phases stationnaires ont toutefois été proposées pour aider à leur sélection adaptée à la nature des composés étudiés [27].

- Les phases stationnaires en silice vierge et les phases stationnaires à groupements amine ont des applications relativement limitées en raison de la forte adsorption de nombreux composés polaires à leur surface.

- Les phases stationnaires à groupements amide permettent des séparations rapides et efficaces de composés très polaires.

- Les phases stationnaires à fonctions zwitterionique sulfobetaine permettent de séparer une large gamme de composés polaires, mais une perte d'efficacité de séparation est observée à des débits de phase mobile importants.

Ces phases stationnaires sont essentiellement commercialisées au format analytique et sont remplies de particules poreuses. Cependant depuis quelques années, de nouveaux supports chromatographiques de nouvelles générations apparaissent augmentant ainsi le nombre de phases stationnaires disponibles.

- Les phases stationnaires monolithiques qui permettent une augmentation du débit sans perte d'efficacité en raison de leur grande perméabilité [30]. Dans le commerce, seuls les monolithes en silice vierge sont disponibles [31]. Ces supports présentent de moins bonnes efficacités de séparation en HILIC comparativement aux monolithes de silices fonctionnalisés par des groupements alkyle disponibles en RP-HPLC [30]. En revanche, de nombreuses études de la littérature décrivent la synthèse en laboratoire de phases monolithiques à supports de greffage variés fonctionnalisés par divers groupements polaires pour de nombreuses applications [31,32]. Les supports de greffages sont composés soit de silice vierge, soit de polymères organiques, soit d'oxydes de métaux (zirconium et titane). En HILIC, les groupements fonctionnels modifiant le support de greffages sont très variés comme les groupements zwitterionique, des groupements amides, les groupements diols...[31,32]

- Les phases stationnaires particulières à supports de greffage autres que la silice vierge, comme les supports d'oxydes de métal (titane ou zircon) ou les supports hybride (silice et carbone) qui ont des résistances mécaniques plus importantes et une stabilité plus élevée vis-à-vis du pH que les supports en silice vierge [30]. Ces phases stationnaires ne sont disponibles commercialement que de manière récente, le nombre d'études reportant leur utilisation est donc restreint [30].

- Les phases stationnaires à particules superficiellement poreuses qui présentent de faibles résistances à l'écoulement et des transferts de masse rapide pour des séparations plus efficaces et des temps d'analyses plus courts qu'avec des colonnes analytiques classiques [33]. Dans le commerce, ces phases stationnaires sont composées majoritairement de silice vierge non fonctionnalisées et, dans une moindre mesure, de silice fonctionnalisée par des groupements amide ou thio-urée. Ces phases stationnaires sont disponibles en format analytique classique et en format capillaire.

- Les phases stationnaires remplies de particules de diamètre interne sub-2  $\mu\text{m}$  qui permettent de réaliser des séparations plus efficaces avec de meilleures résolutions à de plus hauts débits mais avec une augmentation de la contre pression significative [34]. La majeure partie des phases stationnaires en HILIC au format analytique sont commercialement disponibles avec des particules sub-2  $\mu\text{m}$  comme les phases stationnaires en silice non fonctionnalisée ou à fonctions amide, cyano, diol...

Un nombre significatif d'études décrit la rétention de composés organiques variés avec l'ensemble des phases stationnaires disponibles en HILIC et ceci permet bien

souvent de choisir une phase stationnaire pour le développement d'une nouvelle méthode de séparation de composés organiques. En revanche, peu d'études sont reportées pour l'analyse de complexes métalliques et de complexes de lanthanides. Dans le cadre du développement d'une méthode de séparation de complexes de lanthanides, le choix d'une phase stationnaire est *a priori* délicat en raison de cette absence de données dans la littérature.

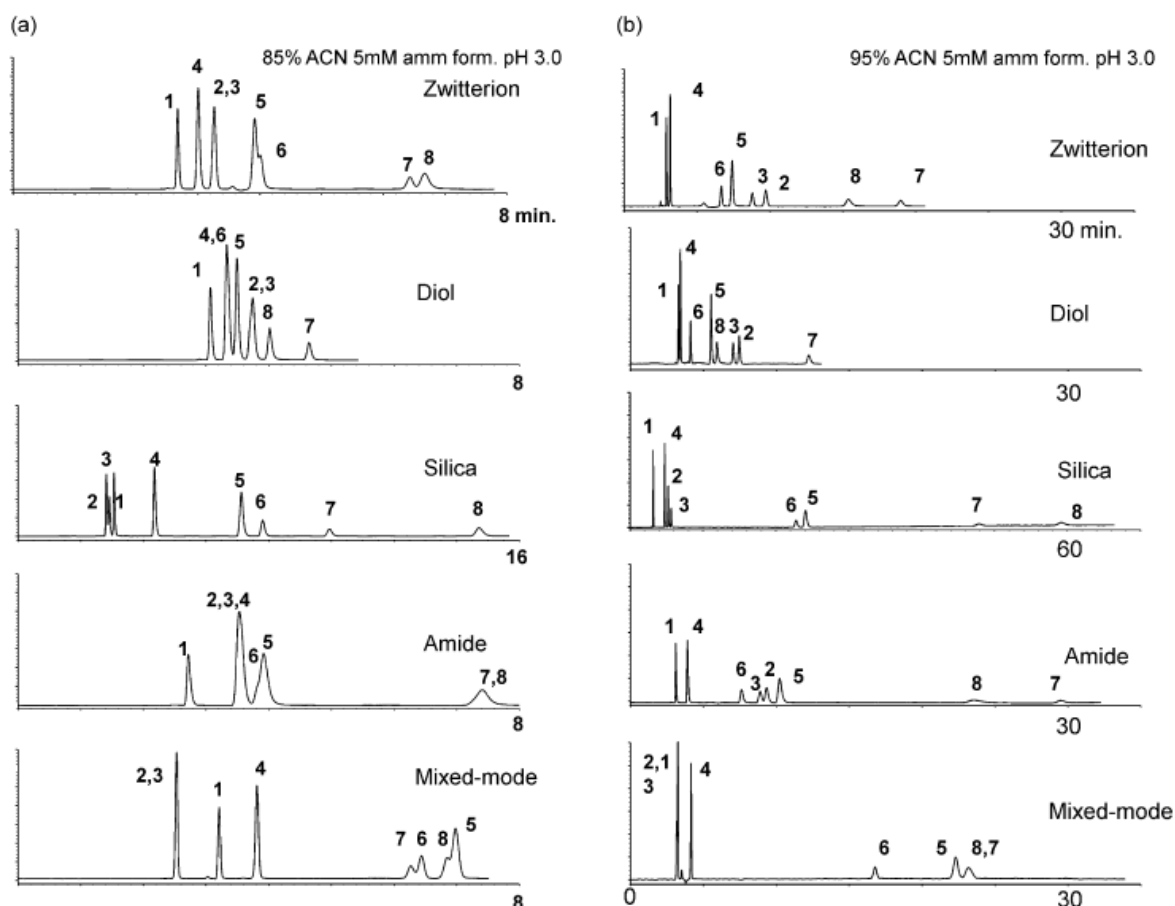
### 2-a-3) Paramètres chromatographiques significatifs

Les autres paramètres influençant la rétention des analytes en HILIC sont la nature et le pourcentage de solvant organique, la nature des sels et leur concentration dans la phase mobile, le pH de la phase mobile et la température.

#### ➤ **Nature et pourcentage de solvant organique dans la phase mobile**

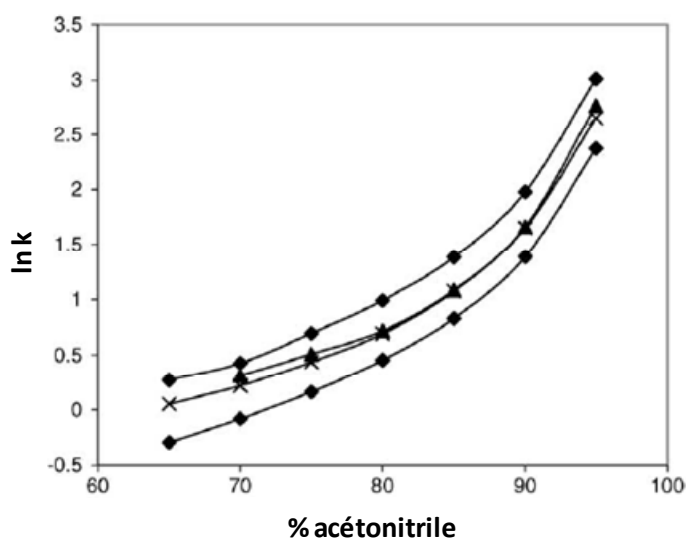
En HILIC, la phase mobile est un mélange hydro-organique. L'acétonitrile est le solvant organique le plus communément utilisé. L'acétonitrile est aprotique et faiblement accepteur de proton, il n'entre donc pas en compétition avec l'eau pour la formation de la couche superficielle adsorbée au niveau de la phase stationnaire polaire. Le solvant dont la force éluante est la plus élevée est l'eau. Lorsque des analytes sont trop retenus, d'autres solvants organiques plus protiques que l'acétonitrile sont utilisés comme les alcools, [26,35]. Les solvants organiques peuvent être classés comme suit en fonction de leur force éluante : Méthanol > éthanol > isopropanol > tétrahydrofurane > acétone > acétonitrile.

Le pourcentage de solvant organique dans la phase mobile est un des facteurs les plus importants en HILIC et l'augmentation de la rétention des composés lorsque la teneur d'acétonitrile dans la phase mobile augmente est caractéristique du mode HILIC (Figure 12).



**Figure 12 : séparation de composés polaires avec différentes phases stationnaires. Phase mobile a) 85/15 AcN/H<sub>2</sub>O (v/v) avec 5 mM de formate d'ammonium, pH 3,0 b) 95/05 AcN/H<sub>2</sub>O (v/v) avec 5 mM de formate d'ammonium, pH 3,0 composés : 1) phénol ; 2) acide 2-naphthalènesulfonique ; 3) acide p-xylènesulfonique ; 4) caféine ; 5) nortriptyline ; 6) diphenhydramine ; 7) benzylamine ; 8) procainamide [28].**

Une explication à l'augmentation de la rétention des analytes quand la teneur en acétonitrile augmente est l'immobilisation de l'eau adsorbée à la surface de la phase stationnaire lorsque la proportion d'acétonitrile dans la phase mobile augmente [26]. Ceci provoque également l'immobilisation des analytes solubilisés dans cette couche d'eau augmentant ainsi leur rétention. De manière générale, l'augmentation de la rétention est observée pour des pourcentages de solvant organique supérieurs à 80 % pour les molécules organiques polaires comme illustré en Figure 13. Une légère variation du pourcentage d'acétonitrile peut donc induire des changements importants de temps de rétention des composés organiques.



**Figure 13 : variation du facteur de rétention de la cytosine en fonction du pourcentage d'acétonitrile et de la phase stationnaire. Groupements amine (carré), zwitterionique (croix), amide (losange) et silice vierge (triangle). Phase mobile : acétonitrile/eau contenant 5 mM d'acétate d'ammonium [36]**

#### ➤ Nature et concentration des sels dans la phase mobile

Les sels utilisés en HILIC sont solubles à fort pourcentage de solvant organique. Les plus communément utilisés sont l'acétate et le formate d'ammonium. Leur volatilité élevée comparée aux sels habituellement utilisés avec d'autres types de chromatographie est compatible avec les conditions de détections de la spectrométrie de masse électrospray. Le couplage de l'HILIC avec l'ESI-MS est donc facilité.

L'augmentation de la concentration en sels dans la phase mobile a généralement pour effet de diminuer les interactions électrostatiques entre les analytes chargés et la phase stationnaire et peut induire deux conséquences antagonistes sur la rétention de ces composés [26] :

- le temps de rétention augmente si les interactions électrostatiques entre le soluté et la phase stationnaire sont répulsives. En effet, les interactions entre les sels et la phase stationnaire permettent de diminuer les phénomènes de répulsions électrostatiques entre le soluté et la phase stationnaire ;
- le temps de rétention diminue si les interactions électrostatiques entre le soluté et la phase stationnaires sont attractives en raison de la compétition des sels avec les solutés.

L'augmentation de la concentration en sels va accroître le volume de la couche enrichie en eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire en raison de leur meilleure solubilité dans l'eau. La rétention des analytes est alors augmentée [26]. Enfin

l'augmentation de la concentration en sels peut également améliorer l'efficacité de la séparation en HILIC et permet d'affiner les pics chromatographiques [37]. C'est pourquoi, la concentration en sels dans la phase mobile est au minimum de 5 mmol.L<sup>-1</sup>.

#### ➤ **pH de la phase mobile**

Le pH de la phase mobile influence l'état de charge de l'analyte dans le cas de composés acides ou basiques. Le pH modifie également celui de la phase stationnaire au niveau des groupements fonctionnels mais aussi au niveau des silanols résiduels présents à la surface du support de greffage.

#### ➤ **Effet de la température**

La température modifie principalement la viscosité de la phase mobile, la diffusion des analytes et leur enthalpie de transfert entre la phase mobile et la phase stationnaire. En HILIC, une augmentation de la température induit généralement une diminution de la rétention des composés [27,36] dans la mesure où le transfert d'un analyte de la phase mobile vers la couche d'eau est exothermique, il est favorisé à basse température.

#### 2-a-4) Avantages et applications

La chromatographie en mode HILIC présente de nombreux avantages. Elle répond au besoin de l'analyse de composés polaires, hydrophiles, neutres ou chargés, acides ou basiques. La grande diversité de phases stationnaires polaires avec des sélectivités très différentes permet la séparation de composés polaires de structures très diverses. La phase mobile riche en solvant organique ainsi que la volatilité des sels utilisés en HILIC sont compatibles avec des conditions de détections en spectrométrie de masse électrospray, améliorant la sensibilité comparée à celle obtenue avec d'autres modes chromatographiques [38]. L'HILIC permet donc de retenir des composés très polaires qui ne le seraient pas en RP-HPLC. L'HILIC est ainsi un mode orthogonal à la RP-HPLC. Ceci permet d'envisager des stratégies de chromatographies multidimensionnelles.

Un autre avantage avancé par certains auteurs, dans le cadre de l'analyse de spéciation est la conservation des interactions non covalentes dans les complexes métalliques lors d'une séparation en mode HILIC [39]. Ceci permet donc de préserver la spéciation d'un élément en solution, contrairement notamment à la chromatographie ionique où les interactions entre la phase stationnaire et le soluté sont fortes et peuvent engendrer la dissociation des espèces d'intérêts.

La chromatographie en mode HILIC est utilisée dans de nombreux domaines comme en sciences du vivant, dans l'environnement, en industrie alimentaire ou encore en pharmaceutique. De nombreux composés polaires comme les sucres [40,41], les acides aminés [42], les peptides [43,44], les métabolites [45,46], les liquides ioniques [47] et les composés pharmaceutiques [48]... Concernant les applications en analyse de spéciation, celles-ci seront détaillées dans le chapitre II.

*Le besoin en analyse de composés polaires et hydrophiles est à l'origine de l'essor et de la démocratisation de la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC). L'HILIC combine les caractéristiques des modes RP-HPLC, NP-HPLC, IC mais présente également des spécificités qui lui permettent de s'imposer comme méthode alternative pour l'analyse de composés polaires, hydrophiles, neutres ou chargés, acides ou basiques. La grande diversité de phases stationnaires polaires disponibles permet d'obtenir des sélectivités variées et adaptées à la séparation de composés de natures très diverses. Le mode de rétention en HILIC résulte de la combinaison de plusieurs mécanismes dont la compréhension peut s'avérer très complexe. Le mécanisme de partage du soluté entre la phase mobile et la couche enrichie en eau partiellement immobilisée à la surface de la phase stationnaire est souvent considéré comme le mécanisme primaire. Des mécanismes secondaires issus des interactions entre la phase stationnaire et les solutés sont également susceptibles d'intervenir. La rétention des composés en HILIC dépend de nombreux paramètres chromatographiques, en particulier la nature de la phase stationnaire qui joue un rôle dominant. La proportion de solvant organique dans la phase mobile a aussi une importance significative. Cette phase mobile riche en solvant organique est compatible avec les conditions de détection en spectrométrie de masse électrospray, ce qui permet d'envisager le couplage de cette méthode de séparation chromatographique avec ce type d'instruments.*

*Dans le cadre du développement d'une méthode d'analyse de spéciation des lanthanides, qui fait l'objet de ce travail, le mode HILIC semble adapté à la séparation des complexes de lanthanides, issues des étapes de désextraction en phase aqueuse des procédés de traitement du combustible, ces espèces étant polaires, hydrophiles et généralement chargées.*



## 2-b) La spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS)

La spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) est une technique d'analyse permettant la détection, l'identification, la caractérisation et la quantification de composés. Le principe général repose sur la séparation en phase gazeuse d'ions en fonction de leur rapport masse sur charge  $m/z$ . L'électrospray est un procédé d'ionisation « doux » à pression atmosphérique, c'est-à-dire peu énergétique, permettant de transférer en phase gazeuse des ions préformés en solution, tout en préservant le plus possible leur intégrité. Un spectromètre de masse ESI-MS est composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur.

### 2-b-1) Principe

#### ➤ La source d'ionisation par électrospray

Dans le cas d'une source d'ionisation électrospray, la génération des ions en phase gazeuse est réalisée par électro-nébulisation. Cette interface a été développée par l'équipe de Yamashita et Fenn [49] dont les travaux sont basés sur les résultats de Dole [50]. Le processus d'électro-nébulisation est présenté dans la Figure 14.

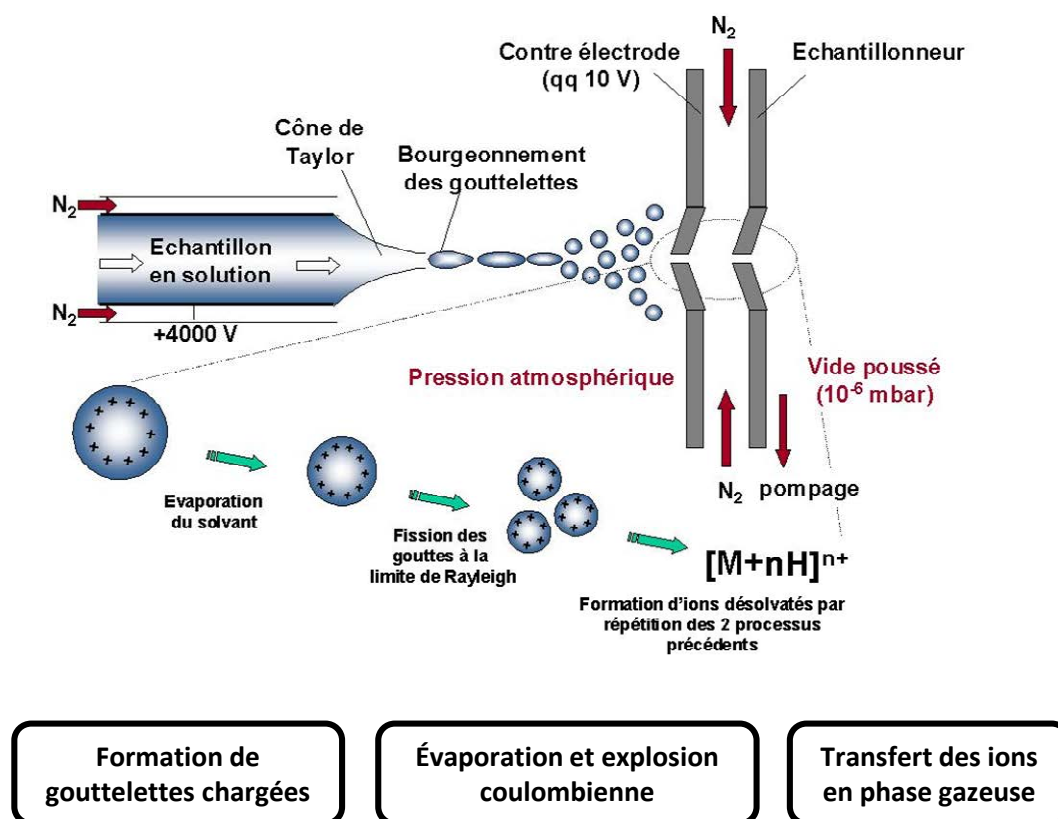


Figure 14 : processus d'obtention des ions en spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (adapté de [51]).

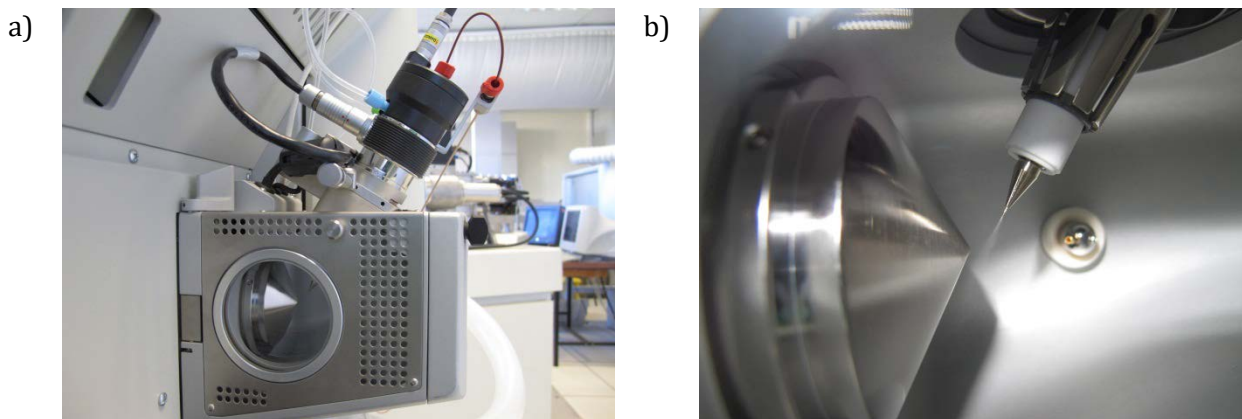
Les principales étapes du processus d'ionisation électrospray sont décrites ci-dessous :

- Formation de gouttelettes à l'extrémité du capillaire : la solution à analyser est introduite dans la source par l'intermédiaire d'un capillaire. Un potentiel électrique ( $\pm 3-5$  kV) est appliqué entre la pointe du capillaire et la contre-électrode Figure 14. Cette haute tension crée une séparation de charge dans le fluide du capillaire et provoque la formation d'un cône de phase mobile appelé cône de Taylor. Lorsque que les forces électriques sont supérieures à la tension de surface des gouttes, les gouttelettes chargées sont créées. Les charges de mêmes signes au sein de la gouttelette se répartissent à la surface de celle-ci.

- Évaporation du solvant et explosion coulombienne : la source est alimentée avec deux flux de gaz, le gaz séchant et le gaz auxiliaire. Le gaz séchant contribue à réduire le diamètre de ces gouttelettes par évaporation progressive du solvant. Le gaz auxiliaire permet de réduire la dispersion spatiale du spray en le focalisant et aide également à l'évaporation du solvant. L'évaporation progressive du solvant par les gaz engendre une augmentation de la densité de charge de la gouttelette. Lorsque le rayon critique est atteint, une explosion coulombienne se produit et provoque la fission de la gouttelette en plusieurs gouttelettes de taille et de charge plus faibles. Ce processus d'évaporation/explosion coulombienne se poursuit jusqu'à ce qu'il ne reste que l'analyte chargé et désolvaté en phase gazeuse.

- Transfert d'ions désolvatés en phase gazeuse : Les ions désolvatés sont ensuite transférés à l'analyseur. L'interface entre la source à pression atmosphérique et l'analyseur sous vide est constituée d'un capillaire de transfert thermostaté et d'optiques ioniques, composées de multipôles et de lentilles de focalisation, permettant de garantir le transport des ions jusqu'à l'analyseur.

La Figure 15 présente la source d'ionisation et le spray obtenu avec l'ESI-MS Triple quadripôle du laboratoire.



**Figure 15 : a) source d'ionisation b) spray de l'ESI-MS TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher)**

Comme indiqué précédemment, l'électrospray est un mode d'ionisation peu énergétique laissant envisager de préserver l'intégrité des espèces sans les fragmenter. L'ESI-MS permet de détecter aussi bien des ions de faible masse que des édifices moléculaires de haute masse comme des protéines. Il est possible de détecter en mode positif et négatif des ions mono chargés ainsi que des ions multichargés.

De nombreux paramètres sont à ajuster afin d'obtenir des conditions de détection optimales, à savoir la meilleure sensibilité et la meilleure stabilité du signal possibles. Les paramètres liés à la source (Figure 15 a) comme la position de la sonde par rapport à l'interface d'entrée de l'analyseur peuvent être modifiés afin de maximiser l'introduction des analytes d'intérêt dans l'analyseur. Les débits de gaz séchant et auxiliaire peuvent être optimisés pour permettre respectivement une désolvatation efficace et une meilleure focalisation du spray. La tension du capillaire appliquée pour ioniser les analytes est réglée afin de maximiser la génération des ions au niveau du spray. Une température de vaporisation peut être appliquée à la sortie du liquide afin d'aider à la désolvatation. Enfin la température du capillaire de transfert peut être ajustée pour parfaire la désolvatation et aidé le transport des ions jusqu'à l'analyseur. Les tensions appliquées aux différents multipôles de l'optique ionique sont réglées afin de focaliser les ions vers l'analyseur.

### ➤ **Les analyseurs de masse**

L'analyseur permet de séparer les ions de la source d'ionisation selon leur rapport  $m/z$ . Il existe de nombreux types d'analyseurs faisant intervenir soit un champ magnétique (résonance cyclotronique ionique(ICR)), soit un champ électrique (temps de vol (TOF), quadripôle(Q), pièges à ions annulaires (IT) ou linéaires (LIT), Orbitrap). Les

analyseurs hybrides, combinaison de deux analyseurs ou plus, permettent d'étendre les possibilités analytiques en termes notamment de sensibilité et de sélectivité.

Les principales caractéristiques d'un analyseur en masse sont les suivants :

- la résolution  $\Delta m/z$ , largeur à mi-hauteur du pic de masse ;
- le pouvoir de résolution  $m/\Delta m$  pour un  $m/z$  donné représentant le pouvoir séparateur de l'analyseur à savoir sa capacité à séparer deux ions de masses voisines ;
- l'incertitude sur la mesure de la masse, c'est-à-dire l'erreur commise lors de la mesure d'une masse exprimée en ppm ;
- la gamme de masse balayée accessible ;
- la vitesse de balayage, à savoir le nombre de spectres de masse acquis par unité de temps exprimé en Hz.

Un analyseur préformant présente ainsi une résolution faible et un pouvoir de résolution élevé.

Le tableau suivant présente les performances des principaux analyseurs commerciaux (Tableau 4).

Analyseur	Constructeur	Pouvoir de résolution $m/\Delta m$ ( $m/z$ fixé)	Résolution $\Delta m/z$	incertitude maximale (ppm)	Gamme de masse	Vitesse de balayage (Hz)
QqQ	Thermo Scientific	7500 ( $m/z$ 508)	0,07	5	10-3000	5
TOF	waters	22500 ( $m/z$ 922)	0,04	<1	20-16000	30
LIT	Thermo Scientific	NS	0,05	NS	15-4000	66
Q-TOF	Agilent	42000 ( $m/z$ 922)	0,02	<1	50-10000	50
Orbitrap	Thermo Scientific	100000 ( $m/z$ 200)	0,002	<2	50-4000	10
Q-ICR	Brücker	2500000 ( $m/z$ 400)	0,0002	<0,25	100-10000	NS

**Tableau 4 : performances analytiques des principaux analyseurs commerciaux [52]**

L'information ciblée et les performances analytiques visées vont conditionner le choix des analyseurs. Ainsi dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules organiques et de la détermination de leur masse exacte, les spectromètres de masse équipés d'analyseurs à haute résolution et haute précision comme l'Orbitrap ou le Q-ICR sont plus adaptés en raison de leur pouvoir de résolution élevé. Le QqQ est plutôt employé pour le suivi de molécules spécifiques ou en quantification. La LIT est

généralement utilisée pour le screening et l'identification de composés en raison de ses modes d'acquisition spécifiques (détaillés ci-dessous) et peut parfois être employée pour la quantification d'espèces.

Deux modes d'acquisition principaux existent pour les analyseurs :

- le mode d'acquisition « fullscan » qui permet de balayer l'ensemble d'une gamme masse et de détecter un nombre important d'ions présent dans la source d'ionisation. Afin d'augmenter la sensibilité du signal ESI-MS, le mode SIM (*Single ion monitoring*) peut être utilisé puisqu'il permet de suivre un rapport  $m/z$  d'intérêt ;

- le mode d'acquisition à fragmentation multiple où un ion précurseur est sélectionné, puis fragmenté. Les ions produits peuvent soit être transportés jusqu'au détecteur, soit subir de nouveau une fragmentation. Lorsque le même analyseur peut être utilisé  $n$  fois comme pour la LIT, celui-ci permet de réaliser de la  $MS^n$ , à savoir de la fragmentation à  $n$  répétitions. Ce mode permet notamment d'obtenir des informations sur la structure d'un composé d'intérêt. Pour les spectromètres possédant deux analyseurs comme le QqQ, seul le mode  $MS^2$  ou tandem est possible. Ce mode est adapté à la quantification d'espèces en raison de la spécificité de la mesure. En effet des ions ayant le même rapport  $m/z$  ne se fragmentent pas de la même façon et ne produisent pas les mêmes ions produits. Le mode  $MS^2$  permet l'utilisation des modes SRM (*single reaction monitoring*) ou MRM (*multiple reaction monitoring*), et permet de suivre une (SRM) ou plusieurs (MRM) transitions de fragmentation d'un précurseur à un ion fils sélectionné. Ce mode d'acquisition est d'ailleurs surnommé « *the golden standard method* » pour la quantification d'espèces [52].

Au laboratoire, l'ESI-MS TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher) est équipé d'un triple quadripôle. Le premier et le dernier quadripôle sont utilisés comme analyseur de masse et le quadripôle central est une chambre de fragmentation par collision avec un gaz inerte. Ce système permet ainsi d'acquérir les spectres en mode SIM, MRM. L'utilisation de ce dernier mode d'acquisition permet d'envisager le développement d'une méthode de quantification spécifique par ESI-MS.

Les limites de détections observées en ESI-MS sont dépendantes des analyseurs et des espèces analysées. Dans le cas de l'ESI-MS TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher), de la réserpine à une concentration de  $0,33 \text{ fmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  peut être détectée en couplage LC-MS.

## ➤ Les détecteurs

De manière générale, les détecteurs implantés sur les spectromètres de masse ESI-MS sont constitués d'une dynode de conversion et d'un multiplicateur d'électrons. Ces détecteurs permettent une amplification des ions de l'ordre de  $10^6$ .

### 2-b-2) Couplages avec des techniques séparatives

Dans le cadre de l'analyse d'échantillons complexes, la mise en œuvre d'une technique séparative en amont de la spectrométrie de masse électrospray permet d'augmenter la sensibilité du signal de composés en raison de la diminution des effets de matrice. La Figure 16 résume les couplages possibles ainsi que les analyseurs employés avec l'ESI-MS.

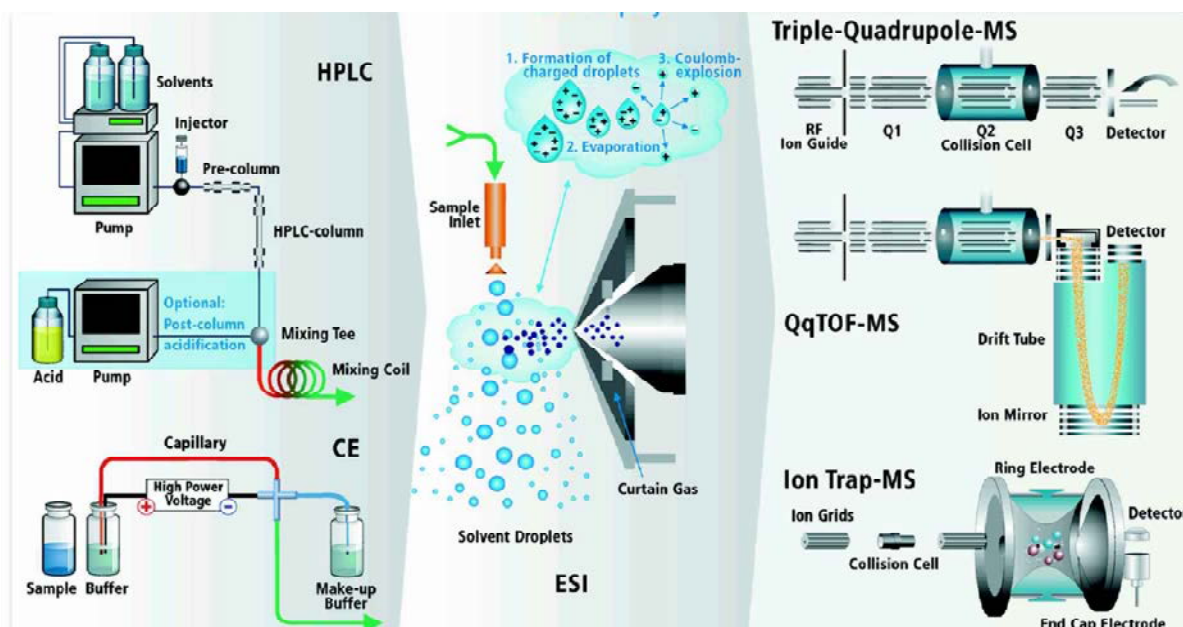


Figure 16 : configurations instrumentales des couplages avec l'ESI-MS [53]

Deux techniques analytiques peuvent être couplées à l'ESI-MS, l'électrophorèse capillaire (CE) et la chromatographie liquide (HPLC). Concernant la CE ESI-MS, les interfaces spécifiques complexes, constituées généralement d'un nébuliseur et de liquides de compensation et les électrolytes supports composant la matrice électrophorétique limitent la démocratisation de ce type de couplage [54]. Le couplage HPLC ESI-MS est beaucoup plus répandu en raison la compatibilité des interfaces ; le flux chromatographique est directement introduit dans le capillaire de la source électrospray. La grande diversité des modes de séparation chromatographique est à l'origine des nombreux développements basés sur ce type de couplage [20,55].

### 2-b-3) Avantages et limites

Les avantages de l'ESI-MS sont les suivants :

- le processus d'ionisation à faible énergie en ESI-MS conserve l'intégrité des ions en solution. Ceci permet d'envisager son utilisation en analyse de spéciation ;
- l'ESI-MS permet une caractérisation structurale d'espèces, de l'ion mono élémentaire monochargé à la protéine multichargée ;
- le couplage avec une technique séparative est aisé ;
- les phases hydro-organiques sont compatibles avec les conditions de détectations de l'ESI-MS ;

Les limites de l'ESI-MS sont les suivantes :

- d'importants effets de matrice sont observés et des effets de suppression de signal d'une espèce peuvent se produire dans certaines matrices complexes. Comme indiqué précédemment la mise en place du couplage de l'ESI-MS à une méthode de séparation permet de remédier à ces effets de matrice ;
- les paramètres de détection sont généralement spécifiques pour un composé puisque le rendement d'ionisation varie selon l'espèce à détecter. Lorsque plusieurs composés sont analysés, un compromis sur les conditions de détectations doit être trouvé.

L'ESI-MS est une technique de détection incontournable pour l'analyse de molécules organiques. Par ailleurs l'ESI-MS est une technique analytique de plus en plus utilisée pour l'analyse de spéciation en raison du processus d'ionisation « doux » à pression atmosphérique permettant de préserver l'intégrité des ions analysés. La compatibilité des phases hydro-organiques avec les paramètres de détectations de l'ESI-MS permet d'envisager le couplage de l'HILIC avec l'ESI-MS.

### ***2-c) La spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS)***

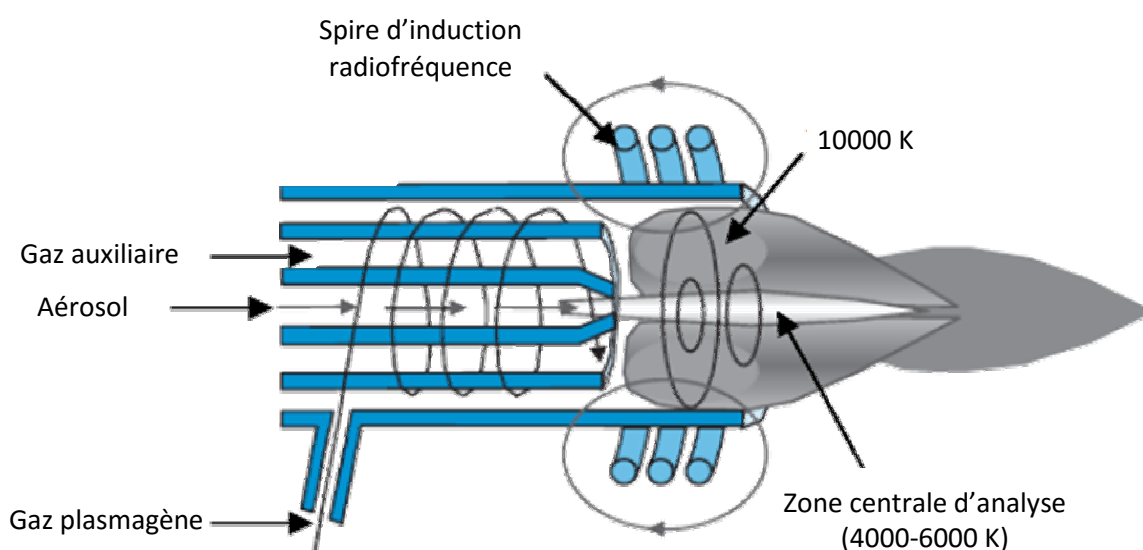
La spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) est une technique de référence en analyse inorganique en raison de ses performances analytiques élevées à la fois pour les analyses élémentaires et pour les mesures isotopiques de haute précision. Les rendements d'ionisation très élevés, obtenus grâce à l'utilisation d'un plasma d'argon, permettent d'analyser un très grand nombre d'éléments parfois difficilement ionisables au moyen d'autres techniques, à des limites de détection de l'ordre de quelques ppt ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). L'ICP-MS est composé d'un système d'introduction d'échantillon, d'une source d'ionisation, d'un analyseur puis d'un

détecteur. Les deux principaux types d'ICP-MS, utilisés au laboratoire sont l'ICP-MS quadripolaire (ICP-Q-MS) et l'ICP-MS à secteurs magnétiques multicollecteur (ICP-SFMS-MC). Leurs principales différences se situent au niveau de l'analyseur et du détecteur et également dans leurs domaines d'applications respectifs. Leur principe général de fonctionnement est décrit ci-après.

### 2-c-1) Principe

#### ➤ **La source d'ionisation en ICP-MS**

La source plasma à couplage inductif est basée sur la formation d'un plasma produit à pression atmosphérique par couplage inductif entre un champ électromagnétique radiofréquence et un flux de gaz rare, généralement l'argon, au sein duquel l'échantillon en solution est introduit sous forme d'un aérosol [56]. La Figure 17 présente le schéma de principe d'une source plasma à couplage inductif appelée également torche à plasma.



**Figure 17 : schéma de la source plasma à couplage inductif (adapté de [57])**

Le plasma est un gaz ionisé, macroscopiquement électriquement neutre et caractérisé par la présence d'électrons libres issus de l'ionisation de l'argon dans celui-ci. Pour obtenir ce plasma, une torche est entourée par une spire d'induction reliée à un générateur de radiofréquence de 27,12 MHz, d'une puissance de l'ordre de 1400 W, conduisant à la génération d'un champ électromagnétique appliqué à un flux d'argon. Le plasma est un milieu très énergétique avec des températures comprises entre 4 000 et 10 000 K. L'énergie de première ionisation de l'argon étant particulièrement élevée



(15,75 eV), la majeure partie ( $\approx 90\%$ ) des éléments du tableau périodique est totalement ionisée sous forme d'ions positifs monochargés.

La torche plasma est généralement constituée de trois tubes concentriques :

- le tube extérieur dans lequel circule le gaz plasmagène avec un débit élevé ( $14 \text{ L.min}^{-1}$ ). Ce flux de gaz est à l'origine de la création du plasma.
- le tube intermédiaire contient le gaz auxiliaire avec un débit plus faible ( $0,5$  à  $2 \text{ L.min}^{-1}$ ). Ce gaz permet de positionner le plasma par rapport à l'injecteur et à la spire.
- le tube interne appelé injecteur conduit le gaz de transport ou de nébulisation transportant l'échantillon sous forme d'aérosol avec un débit compris en  $0,6$  et  $1,2 \text{ L.min}^{-1}$ . Généralement composé d'argon, de l'oxygène peut être introduit dans ce flux de gaz afin de favoriser la combustion d'échantillons riches en carbone.

### ➤ Générations des ions

La génération des ions passe tout d'abord par la formation d'un aérosol à partir de l'échantillon liquide. Cet aérosol est formé à l'aide d'un nébuliseur qui permet de transformer le liquide en un brouillard de fines gouttelettes. Le nébuliseur est généralement de type pneumatique, à savoir que l'aérosol est formé par l'interaction du liquide avec le gaz de nébulisation. Le nébuliseur est fixé dans la chambre de nébulisation qui permet la sélection des gouttelettes en fonction de la taille. Seules les gouttelettes de diamètre inférieur à  $10 \mu\text{m}$  sont introduites dans le plasma pour être totalement désolvatées et pour éviter de le déstabiliser, voire même de l'éteindre. Différents types de chambre de nébulisation sont disponibles comme la chambre de nébulisation cyclonique, de Scott ou à impact à billes. Les gouttelettes sont donc transportées par le gaz de nébulisation via l'injecteur jusqu'au plasma d'argon. Ce dernier transmet alors son énergie à l'aérosol. Différents étapes successives permettent de passer des analytes présents en milieu liquide aux ions détectés par l'analyseur :

- Désolvatation : le plasma provoque l'évaporation du solvant à la surface de l'analyte.

- Vaporisation : les analytes sont transférés à l'état gazeux sous forme d'espèces individuelles.

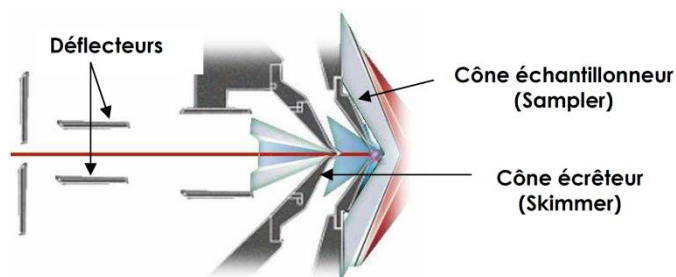
- Dissociation (atomisation) : les espèces individuelles sont dissociées en atomes.

- Excitation et ionisation : la température et l'énergie élevées du plasma d'argon provoque l'excitation des atomes. Si leur énergie d'ionisation est inférieure à celle de l'argon, les atomes sont ionisés.

### ➤ Interface et optique ionique

L'interface permet de passer d'un plasma à haute température et à pression atmosphérique au vide de l'analyseur à température beaucoup plus faible.

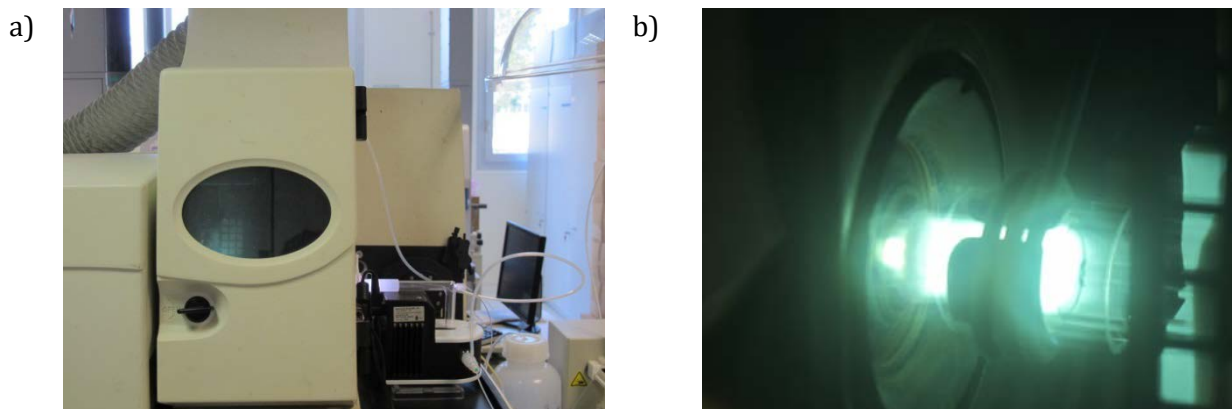
L'interface est composée de deux cônes, l'échantillonneur (sampler) et l'écrêteur (skimmer). L'échantillonneur permet d'extraire les ions du plasma (Figure 18).



**Figure 18 : interface et optique ionique d'un ICP-MS**

Derrière ce cône, un vide primaire ( $10^{-4}$  bars) provoque une détente adiabatique et un jet supersonique du faisceau d'ions. Le cône écrêteur permet ensuite de prélever le centre du jet supersonique et transmet les ions vers une chambre où le vide est plus important ( $10^{-7}$  bars). Une dispersion des ions se produit derrière ce cône. Le faisceau d'ions est ensuite focalisé à l'aide de lentilles électrostatiques. Des déflecteurs permettent enfin de dévier le faisceau ionique de l'axe afin qu'aucun photon ne soit transmis aux détecteurs et ne l'endommage.

La Figure 19 présente la chambre de nébulisation et la source d'ionisation ainsi que le plasma obtenu lors des analyses réalisées avec l'ICP-MS X series II (Thermo Fisher) du laboratoire.



**Figure 19 : a) source d'ionisation b) plasma de l'ICP-MS X series II (Thermo Fisher)**

Les paramètres d'optimisation du signal en ICP-MS sont nombreux. Tout d'abord, comme en ESI-MS, la position du plasma par rapport à l'entrée de l'analyseur est primordiale. En effet, la répartition des ions au sein du plasma n'est pas la même suivant la masse de l'élément à analyser. Ensuite les différents débits d'argon sont à ajuster afin d'obtenir un transport de l'aérosol et une stabilité optimale du plasma. Enfin l'ajustement de l'optique ionique permet de maximiser le transport des ions jusqu'à l'analyseur.

### ➤ Les analyseurs de masse et détecteurs

Comme indiqué précédemment, l'ICP-Q-MS et l'ICP-SFMS-MC utilisés au laboratoire présentent des caractéristiques différentes au niveau de leur analyseur et leur système de détection :

- pour les ICP-Q-MS, l'analyseur est un quadripôle composé de quatre barreaux cylindriques parallèles. Une tension formée de composantes continues et alternatives est appliquée à chaque couple de barreaux diamétralement opposés, les deux tensions ne différant que par leur signe. Cet analyseur se comporte comme un filtre passe bande qui permet la stabilisation d'un seul rapport  $m/z$  à la fois. Un balayage séquentiel rapide permet la réalisation d'analyses multi-élémentaires avec des incertitudes de l'ordre du pourcent, avec une résolution de l'ordre de 1 uma, limitante pour résoudre des interférences isobariques. Les ions sélectionnés par le quadripôle sont ensuite détectés par un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes qui fonctionne soit en mode comptage d'impulsions ioniques, soit en mode analogique lorsque l'intensité mesurée est trop élevée. Ce type d'instrument est donc adapté à la quantification multi-élémentaire avec des incertitudes de mesure de l'ordre du %.

- pour l'ICP-SFMS-MC de type Neptune Plus, Thermo Fisher, du laboratoire, l'analyseur est composé d'un secteur électrostatique et un secteur magnétique. Dans ce type de dispositif dit « à double focalisation », le secteur électrostatique filtre les ions en énergie avant l'entrée dans le secteur magnétique qui permet la dispersion spatiale de plusieurs faisceaux d'ions de rapport  $m/z$  différents.

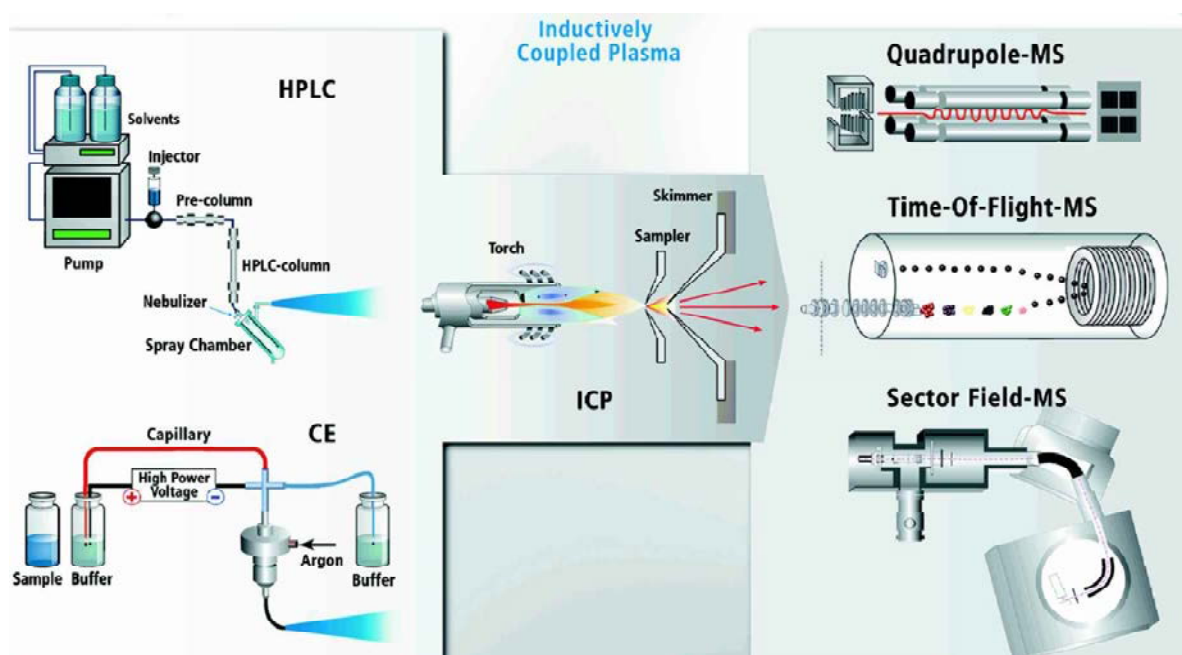
Ces faisceaux sont ensuite détectés de façon simultanée par un bloc multi collection constitué de plusieurs cages de Faraday amplifiant les signaux grâce à des résistances de forte impédance (  $10^{10}$  et  $10^{11} \Omega$  ) convertissant des courant d'ions de  $10^{-11}$  à  $10^{-14}$  A.

L'ICP-SFMS-MC du laboratoire présente une résolution allant jusqu'à 10000 et est plutôt adapté à l'analyse de haute précision (‰ et inférieurs) de rapports isotopiques.

- d'autres types d'analyseurs comme les temps de vol (TOF) et les pièges à ions (IT) sont disponibles dans le commerce, mais ne sont pas détaillés ici.

### 2-c-2) Couplages de l'ICP-MS avec des méthodes séparatives

De même que pour l'ESI-MS, l'ICP-MS peut être couplé à l'électrophorèse capillaire et à la chromatographie liquide. La Figure 20 résume les couplages classiquement rencontrés ainsi que les analyseurs employés.



**Figure 20 : configurations instrumentales classiques des couplages avec l'ICP-MS [53]**

Le couplage de l'ICP-MS avec l'électrophorèse capillaire est moins répandu que celui avec la chromatographie liquide, du fait de sa complexité de mise en œuvre [20]. Des études de séparation des lanthanides basées sur ce couplage sont toutefois décrites [58,59]. En revanche même si le couplage HPLC ICP-MS est plus fréquent [60,61], des précautions sont nécessaires pour obtenir des conditions d'analyse stables, en particulier dans le cas de séparations chromatographiques où des solvants organiques, des sels ou des modificateurs de phase organique sont utilisés [62,63]. Dans ces conditions, des moyens sont mis en œuvre pour obtenir des conditions de détection ICP-MS performantes [64,65]. Tout d'abord, de l'oxygène peut être introduit dans le plasma pour permettre l'oxydation du carbone en  $\text{CO}_2$  afin d'éviter les dépôts de carbone graphite à l'entrée de l'analyseur qui peut aller jusqu'à l'obstruction de l'interface.

Ensuite des systèmes de refroidissement de la chambre de nébulisation notamment par effet Peltier conduisent à la condensation des solvants organiques dans la chambre de nébulisation et à diminuer leur impact sur le plasma. De même des chambres de nébulisation à faible taux de chargement, ou encore des systèmes de désolvatation pour obtenir un aérosol sec peuvent être mis en place pour diminuer le transport des solvants dans le plasma et améliorer le signal des analytes. Dans le cadre de l'analyse de spéciation, le couplage HPLC ICP-MS est décrit comme une méthode incontournable pour le suivi et la quantification des éléments contenus dans des espèces cibles [66]. De plus ce couplage permet d'envisager la résolution d'interférences isobariques, problématique importante en particulier lors de l'analyse d'échantillons contenant des lanthanides et également lors de la quantification des radionucléides contenus dans les échantillons nucléaires.

### 2-c-3) Avantages et limites

Les avantages de l'ICP-MS sont présentés ci-après :

- l'ICP-MS peut analyser plus de 90 % des éléments de la classification périodique grâce la forte efficacité d'ionisation de la source à plasma d'argon ;
- peu d'effets de matrices sont observés en ICP-MS comparés à l'ESI-MS;
- les performances élevées en termes de sensibilités et de limites de détection des éléments, inférieures l'ordre de la ppt, ainsi que les faibles niveaux d'incertitudes associés aux mesures élémentaires et isotopiques font de l'ICP-MS une technique analytique la plus répandue dans le domaine de l'analyse élémentaire et isotopique de précision ;
- la caractérisation isotopique des espèces et leur quantification par les approches de dilution isotopique peuvent être mises en œuvre et ce, à de hauts niveaux de précision.

En revanche l'ICP-MS ne permet pas l'identification et la caractérisation des espèces contenant les éléments d'intérêt si elle est utilisée sans méthode préalable de séparation. De plus, l'introduction de solvants organiques dans la source de l'ICP-MS tend à diminuer les performances analytiques de cet instrument.

Ainsi l'ICP-MS présente donc des caractéristiques complémentaires à l'ESI-MS, dans le cadre de l'étude de spéciation exhaustive des lanthanides qui fait l'objet de ce travail. Les spécificités des spectromètres de masse ESI-MS et ICP-MS sont rassemblées dans le Tableau 5.

ESI-MS	ICP-MS
Informations moléculaires et structurales	Informations élémentaires
Informations isotopiques possibles	Informations isotopiques précises
Ionisation à faible énergie	Ionisation à haute énergie
Liaisons covalentes et non covalentes préservées	Liaisons covalentes et non covalentes détruites
Ionisation très sensible aux effets de matrices	Ionisation peu sensible aux effets de matrices
Quantification dépendante de l'ionisation des espèces d'intérêt	Quantification précise basée sur le signal des isotopes des éléments
Identification de nouvelles espèces possible	Identification de nouvelles espèces moléculaires délicate
Couplage HPLC possible	Couplage HPLC possible

**Tableau 5 : spécificités des spectromètres de masse ESI-MS et ICP-MS**

Les spécificités de l'ESI-MS et de l'ICP-MS en font des techniques d'analyse permettant d'acquérir des données de spéciations complémentaires. L'ESI-MS permet une identification moléculaire et structurale des composés d'intérêt en raison du processus d'ionisation doux préservant les liaisons covalentes et non covalentes. L'ICP-MS permet une caractérisation isotopique et élémentaire en raison de la forte efficacité d'ionisation de la source à plasma d'argon permettant d'analyser la majeure partie des éléments de la classification périodique.

En revanche, ces spécificités, prises de manière conjointe, sont peu compatibles et ceci devra être pris en compte pour un couplage simultané de ces deux techniques chromatographiques avec une séparation chromatographique.

*Le prochain chapitre est consacré à l'étude bibliographique concernant les développements analytiques réalisés dans le cadre du suivi et de la quantification d'agents de contraste à base de gadolinium ou de l'analyse de spéciation des lanthanides et des métaux. Les couplages de différentes techniques chromatographiques, dont récemment l'HILIC, à divers modes de détection y sont recensés ainsi que la mise au point et l'utilisation du couplage simultané de séparations chromatographiques à l'ESI-MS et l'ICP-MS pour l'analyse de spéciation.*



## **Chapitre II**

### **Étude bibliographique**



Ce chapitre est consacré à l'étude bibliographique concernant les séparations chromatographiques appliquées à l'étude d'espèces métalliques, de lanthanides et d'organo-éléments. Cette étude bibliographique a pour but de présenter les développements existant en matière de méthodes séparatives couplées à divers modes de détection afin d'en connaître les avantages et les inconvénients pour le développement de notre méthode d'analyse de spéciation exhaustive des lanthanides. La première partie est consacrée à la revue des modes chromatographiques, autres que le mode HILIC, dédiés à la séparation des espèces de lanthanides. Dans la famille des lanthanides, seules les séparations des espèces de gadolinium sont documentées. Celles-ci sont employées pour l'analyse d'agents de contraste, contenant exclusivement du gadolinium, utilisés dans le domaine médical. Ces études ont principalement pour but le suivi et la quantification de ces agents de contraste ainsi que l'étude de leur stabilité dans diverses matrices biologiques et environnementales. Bien que ces méthodes n'aient pas pour objectif l'analyse de la spéciation du gadolinium, les méthodologies analytiques utilisées sont susceptibles d'être transposées à l'analyse de spéciation de l'ensemble des lanthanides. La deuxième partie est focalisée sur l'état de l'art de l'application du mode HILIC dans le domaine de l'analyse de spéciation. Ce mode de séparation étant adapté à la séparation de composés polaires et hydrophiles, de nombreuses études décrivent l'utilisation de l'HILIC pour le suivi, l'identification, la caractérisation et la quantification de complexes métalliques et de lanthanides mais également d'espèces contenant des organo-éléments. L'analyse de ces études nous permettra de connaître les conditions chromatographiques pouvant mener à la séparation de complexes polaires et hydrophiles et de les adapter à l'analyse de spéciation des lanthanides en HILIC. La dernière partie est consacrée à la présentation des développements de méthodes séparatives couplées simultanément à l'ESI-MS et à l'ICP-MS afin de pouvoir appréhender les paramètres instrumentaux importants pour la mise en place d'un tel couplage.

## **1 Séparation chromatographique d'espèces de lanthanides selon différents modes de rétention**

Les séparations de lanthanides par diverses techniques chromatographiques décrites dans la littérature concernent essentiellement les composés de gadolinium à ligands polyaminocarboxyliques linéaires et macrocycliques. Ces complexes de gadolinium sont

utilisés depuis une trentaine d'années à des fins de diagnostic, en tant qu'agents de contraste dans le domaine de l'imagerie médicale. L'utilisation intensive de tels composés a soulevé la question de leur impact sur l'homme et sur l'environnement. Par conséquent, des méthodes chromatographiques ont été développées pour le suivi, la séparation, la quantification et l'évaluation de la stabilité de ces agents de contraste dans des matrices biologiques et environnementales.

Le Tableau 6 référence les modes de séparation, autres que l'HILIC, mis en œuvre pour ces problématiques. Les paramètres chromatographiques, le type de détection associé, la nature des analytes et leur matrice associée ainsi que les méthodes de quantification employées sont également reportés. Les structures des complexes de gadolinium présentés dans ce tableau sont répertoriées en annexe 1.

Mode de séparation/ Détection	Phase stationnaire	Phase mobile	Débit (ml. min <sup>-1</sup> ) Mode	Matrice	Espèces	Méthode de quantification	Réf.
RP-HPLC/ Fluorescence ICP MS	Synergi max C12 (250 x 4,6 mm ; 4µm)	50 mM TRIS + 2 mM EDTA, pH 7,4	1 Isocratique	Nanoémulsions Eau/huile	Gd-EDTA, Gd-DTPA	Dilution isotopique non spécifique en RP- HPLC ICP-MS avec <sup>157</sup> Gd	[67]
RP-HPLC/ LTR	Kromasil C8 (150 x 4,6 mm ; 5µm)	TRIS-HCl (pH 7,6)/ACN (98/2)	0,6 Isocratique	Échantillons modèles	Gd-DOTA, Gd-CDTA	Étalonnage externe en Gd-DOTA, Gd-CDTA	[68]
RP-HPLC/ Fluorescence	Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm ; NS)	50 mM TRIS-HCl (pH 7,4) + 10mM CDTA/ACN (98/2)	1 Isocratique	Échantillons modèles	Gd-EDTA, Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-CDTA	Étalonnage externe en Gd-EDTA, Gd-CDTA	[69]
RP-HPLC/ Fluorescence	Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm ; NS)	50 mM TRIS + 2 mM EDTA (pH 7,3)/ACN (98/2)	NS	Échantillons modèles	Gd-EDTA, Gd-DTPA, Gd-DOTA	Étalonnage externe en gadolinium	[70]
RP-HPLC/ ESI-MS	Delta Pak C18 (150 x 2 mm ; 5µm)	Éluant A : 0,1 % TFA Éluant B : 0,1 % TFA dans ACN	0,2 Gradient	Cellules sanguines humaines	Gd-DOTA Gd-DTPA Gd-DTPA-BMA	Ø	[71]
RP-HPLC/ Fluorescence radiographie <sup>153</sup> Gd	Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm ; NS)	50 mM TRIS acétate+ 2 mM EDTA, pH 7,3/ ACN (98/2)	NS	Échantillons modèles	Gd-EDTA Gd-DTPA Gd-DOTA, Gd-HP-DO3A Gd-DO3A	Étalonnage externe en Gd-EDTA Gd-DTPA Gd-DOTA, Gd-HP-DO3A Gd-(DO3A)	[72]

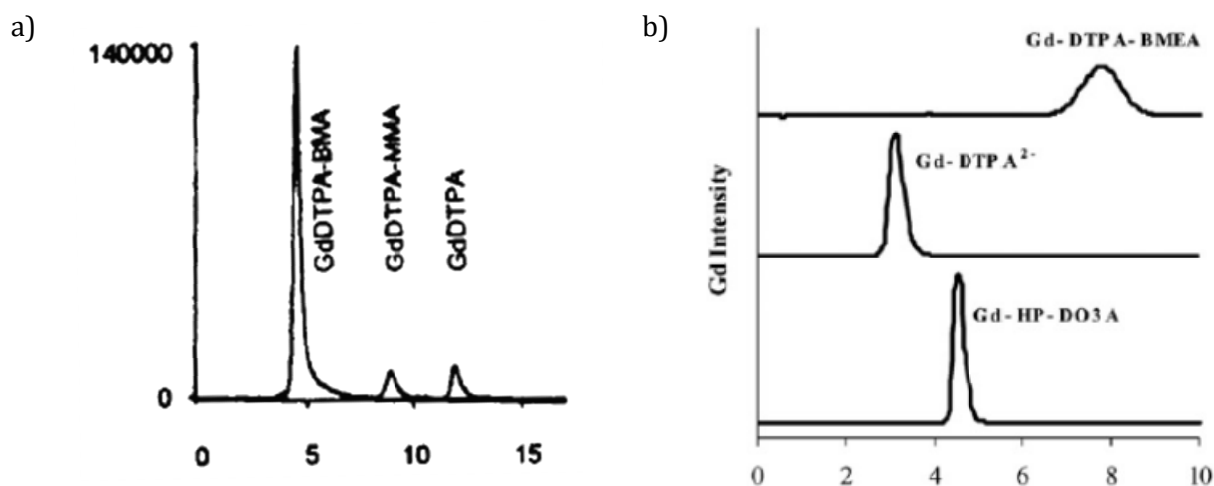
RP-HPLC/ ICP OES UV	Lichrospher RP-8 (250 x 4,6 mm ; 5 µm)	0,01 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / Méthanol (88/12)	1 Isocratique	Échantillons modèles	Gd-acide 10-[2-[2- hydroxy-1- 1(hydroxyméthyl)éth yl)amino]-2-oxo-1- [(phénylméthoxy)mét hyl]éthyl]-1,4,7,10- tétraazacyclododécan e-1,4,7triacétique Et deux produits de thermo-dégradation	Ø	[73]
RP-HPLC/ ICP OES ESI-MS	XTerra RP C18 (250 x 4,6 ; 5 µm)	10 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO	1 Isocratique	Échantillons modèles	Gd-DTPA-BMEA, Gd-DTPA, Gd-HP-DO3A	Étalonnage externe en RP-HPLC ICP OES avec Gd-DTPA-BMEA, Gd-DTPA, Gd-HP-DO3A Gd- DTPA-BMA Gd-DOTA Gd-BOPTA	[74]
	Synergi RP-Hydro C18 (250 x 4,6 mm ; 4 µm)	10 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO			Gd-DTPA-BMA Gd-DOTA		
	BDS Hypersil RP-C 18 (50 x 4,6 ; 3 µm)	10 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO/ACN (95/5)			Gd-BOPTA		
RP-HPLC/ ICP OES ESI-MS	XTerra RP C18 (250 x 4,6 ; 5 µm)	10 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO	1 Isocratique	Tissus de mammifères (bovin, rat)	Gd-DTPA-BMEA, Gd-DTPA, Gd-HP-DO3A	Étalonnage externe en RP- Gd-DTPA-BMEA, Gd-DTPA, Gd-HP-DO3A Gd-DTPA-BMA Gd-DOTA Gd-BOPTA	[75]
	Synergi RP-Hydro C18 (250 x 4,6 mm ; 4 µm)	10 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO			Gd-DTPA-BMA, Gd-DOTA		
	BDS Hypersil RP-C 18 (50 x 4,6 ; 3 µm)	10 mM NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO/ACN (95/5)			Gd-BOPTA		
IP-HPLC/ UV	LiChrospher 100 RP-8 (250 x 4,6 ; 5 µm)	n-octylamine/ACN 72/28 pH 6	1 Isocratique	Plasma humain	Gd-BOPTA	Étalonnage externe en Gd-BOPTA	[76]
		n-octylamine/ACN 73/27 pH 6		Bile et urine humaines			
		n-octylamine/ACN 74/26 pH 6		Fèces et tissus humains			

IP-HPLC/ UV dérivation post colonne	Supelcosil LC-18-DB (250 x 2,1 mm ; 5 µm)	10 mM TEAA + 2 mM EDTA (pH 6,5-7)	0,3 Isocratique	Sérum et urine humains	Gd-DTPA, Gd-DTPA-MMA, Gd-DTPA-BMA	Étalonnage externe en Gd-DTPA-BMA	[77]
IP-HPLC/ UV radiographie <sup>153</sup> Gd	Alltech C18 (250 x 4,6 ; 10 µm)	2,5 mM octylamine + 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / ACN (85/15)	2 Isocratique	Échantillons modèles	Gd-DTPA	Étalonnage externe en Gd-DTPA	[78]
		Octylamine ou TEA-Br (1 à 8 mM) + 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / ACN (90/10)					
IP-HPLC/ UV dérivation post colonne	Supelcosil LC-18-DB (250 x 2,1 mm ; 5 µm)	10 mM TEAA + 2 mM EDTA (pH 6,5-7)	0,3 Isocratique	Sérum et urine humains	Gd-DTPA, Gd-DTPA-MMA, Gd-DTPA-BMA	Étalonnage externe en Gd-DTPA-BMA	[79]
IP-HPLC/ UV TD-NMR	LiChrospher RP-8 (250 x 4,7 ; NS)	eau/méthanol (83,5/16,5) 7,5 mM perchlorate de TBA	2 Isocratique	Plasma humain	Gd-DTPA (non détecté en UV)	Étalonnage externe en IP-HPLC TD-NMR en Gd-DTPA	[80]
IP-HPLC/ Fluorescence	LiChrospher 100 RP-8 (250 x 4,6 ; 5 µm)	30 mM de tampon HEPES (pH 6) + 1 mM EDTA + 1 mM TBA-Br/ Méthanol (90/10)	1 Isocratique	Échantillons modèles	Gd-DTPA	Étalonnage externe en Gd-DTPA	[81]
IP-HPLC/ UV	Hypersil-ODS (200 x 4,6 ; 5 µm)	6,8 mM TBA-H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /ACN (74/26)	1 Isocratique	Urine, plasma, bile humains	Gd-BOPTA	Étalonnage externe en Gd-BOPTA	[82]
SEC/ ICP-MS	BioSep SEC-S 2000 (300*7,8 mm ; 5µm)	17 mM SDS + 2 mM EDTA, pH 7	0,7 Isocratique	Nanoémulsions Eau/huile	Gd-EDTA, Gd-DTPA, Gd-DTPA-DMPE	Dilution isotopique spécifique ( <sup>160</sup> Gd-EDTA, <sup>156</sup> Gd-DTPA, <sup>155</sup> Gd-DTPA-DMPE et non spécifique	[67]
SEC/ ICP-MS	BioSep-SEC-S3000 (300 x 7,8 mm ; 5 µm)	20 mM TRIS-HCl (pH 7,4)	1 Isocratique	Urine, salive, sueur, cheveux humains	Gd-DTPA	Étalonnage externe en gadolinium	[83]

SAX-HPLC/ UV	PRP X 100 (150 x 4,1 ; 10 µm)	0,01 NaOH + EDTA (0 à 10 mM) + KCl (0 à 0,2 M) + citrate (10 mM) + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 Isocratique	Échantillons modèles	Gd-PBMNTA	Étalonnage externe en Gd-PBMNTA	[84]
SAX-HPLC/ UV	PRP X 100 (150 x 4,1 ; 10 µm)	0,1 M TRIS + 0,025 M KCl + 1mM EDTA pH8	de 1 à 4 mL.min <sup>-1</sup> en 7 min Isocratique	Échantillons modèles	Gd-PBMNTA Gd-EDTA (non détecté) Gd-DTPA (non détecté)	Étalonnage externe en Gd-PBMNTA	[85]
IMAC / ICP-MS	Chelating Sepharose Hi-TRAP (250 x 0,7 ; 34 µm)	10 mM BIS-TRIS pH 6	1 Isocratique	Sérum humain	Gd-DTPA-BMA, Gd-DTPA-BMEA, Gd-DTPA, Gd-BOPTA, Gd-EOB-DTPA, Gadofosveset, Gd-BT-DO3A, Gd-HP-DO3A, Gd-DOTA	Étalonnage externe en gadolinium	[86]
Affinité HPLC/ UV Radiographie	Cyclobond I (250 x 4.6 mm ; NS)	10 mM TEAA/ Méthanol (75/15)	1 Isocratique	Urine, sang, sérum de rongeur	Gd-DTPA-BMA	Étalonnage externe en Gd-DTPA-BMA	[87]

**Tableau 6 : bilan des études de l'analyse des agents de contraste à base de gadolinium par différents modes chromatographiques. Les formules des différentes espèces de gadolinium sont présentées en annexe 1. RP-HPLC : chromatographie de partage en phase inverse ; IP-HPLC : chromatographie d'appariement d'ions ; SEC : chromatographie d'exclusion stérique ; LTR : luminescence résolue en temps ; TD-NMR : résonance magnétique nucléaire en temps réel ; SAX-HPLC : chromatographie d'échanges d'anions ; IMAC : chromatographie d'affinité par ions métalliques immobilisés ; TEAA : acétate de triéthylammonium ; TEA : triéthylammonium ; SDS : dodécylsulfate de sodium ; TBA : tributylammonium ; TBA-Br : bromure de tributylammonium ; TFA : acide trifluoroacétique ; CDTA : Acide cyclohexanediamine-1,2-tétraacétique ; Ø : absence de méthodes de quantification ; NS : non spécifié**

D'après le Tableau 6, les espèces analysées par différents modes chromatographiques sont essentiellement formées de gadolinium complexé par différents ligands polyaminocarboxyliques. Les modes de séparations les plus utilisés pour la séparation des complexes de gadolinium sont la chromatographie de partage en phase inverse (RP-HPLC) et la chromatographie d'appariement d'ions (IP-HPLC) (annexe 2). Les moyens de détection associés le plus fréquemment sont la fluorescence et la détection UV-visible, pour lesquels une étape de dérivation post-colonne peut être nécessaire. En effet, certains complexes de gadolinium sont transparents en UV-visible comme le Gd-DTPA ou le Gd-EDTA. Il est alors nécessaire d'ajouter une étape de dérivation des composés d'intérêt afin de pouvoir les détecter en UV-visible. Un agent chélatant absorbant dans l'UV-visible est ajouté après la colonne et avant la détection UV-visible. Celui-ci va réagir avec les complexes de gadolinium et permettre leur détection. Les agents de dérivation sont généralement hautement toxiques et l'ajout de ce flux de dérivation diminue l'efficacité de la séparation. À titre d'exemple, la Figure 21 présente la séparation d'agents de contraste par IP-HPLC couplée à un détecteur UV après une étape de dérivation post-colonne (1a) et RP-HPLC couplée à un ICP-OES (1b) :



**Figure 21 : séparation de complexes de gadolinium par a) IP-HPLC-UV avec dérivation post colonne (conditions voir Tableau 6 [79]) par b) RP-HPLC ICP-OES (conditions voir Tableau 6 [74])**

Cette figure montre qu'en IP-HPLC, l'élution des composés s'effectue par ordre de charge croissante puisque le Gd-DTPA-BMA est neutre, le Gd-DTPA-MMA est monochargé et le Gd-DTPA est dichargé. Ainsi dans le cas de la séparation de complexes ayant la même charge comme dans notre étude, des difficultés de séparation peuvent être attendues en IP-HPLC. En RP-HPLC, l'ordre d'élution est inversé puisque les composés chargés sont élués en premier. Concernant les composés neutres du Gd-DTPA-

BMEA et Gd-HP-DO3A, leur différence d'hydrophobie permet de les séparer. Dans notre étude, les complexes étant composés de lanthanides coordonnés par le même ligand, leur hydrophobie est très similaire, des difficultés de séparation peuvent donc ainsi être attendues en IP-HPLC.

Comme le montre le Tableau 6, les phases mobiles utilisées dans ces études en RP-HPLC et en IP-HPLC sont majoritairement aqueuses avec, au maximum, respectivement 5 % et 15 % de solvant organique. Dans le cadre de l'analyse de complexes à ligands avec un cycle aromatique (Gd-acide 10-[2-[2-hydroxy-1-1(hydroxyméthyl)éthyl]amino]-2-oxo-1-[(phénylméthoxy)méthyl]éthyl]-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7triacétique et Gd-BOPTA) [73,76,82], un pourcentage de solvant organique plus élevé est nécessaire pour permettre l'élution de ces complexes. La partie aqueuse des phases mobiles en IP-HPLC et en RP-HPLC contient des sels comme les phosphates de potassium, des tampons comme le TRIS ou l'HEPES, des agents chélatants comme l'EDTA et des agents d'appariement d'ions comme la n-octylamine ou le bromure de tétraéthyleammonium. Dans le cadre de notre étude de spéciation des lanthanides où la technique séparative doit être couplée aux spectrométries de masse ESI-MS et ICP-MS, la composition de ces phases mobiles ne semble pas adaptée aux conditions de détection de ces deux spectrométries de masse à cause des effets de suppression d'ions possibles en ESI-MS avec ces sels peu volatils et de la forte charge en carbone des modificateurs de phase organiques inappropriée en l'ICP-MS.

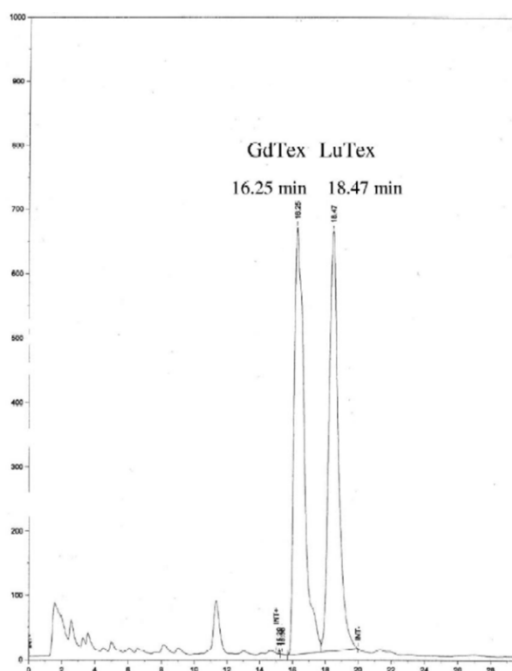
Comme le montre le Tableau 6, la RP-HPLC et l'IP-HPLC ont également été couplées à la radiographie, à la TD-NMR, à l'ICP-MS, à l'ICP-OES ou à l'ESI-MS mais dans une moindre mesure. Ces modes de détection ont été utilisés pour suivre et quantifier spécifiquement le gadolinium au sein des complexes et pour, parfois, confirmer les espèces détectées par fluorescence et UV-visible. Les études reportant l'utilisation de l'ICP-MS, l'ICP-OES et l'ESI-MS sont également moins nombreuses en raison de l'apparition récente de ces instruments et de leur coût beaucoup plus élevé.

Les données présentées dans le Tableau 6 indiquent également que la chromatographie d'échange d'anions (SAX-HPLC), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et la chromatographie d'affinité par ions métalliques immobilisés (IMAC) sont plus rarement utilisées pour la séparation de complexes de gadolinium. La SEC a notamment été utilisée en raison de sa plus grande capacité d'analyse pour l'étude de la dégradation des agents de contraste dans divers compartiments du corps humain (urine,



salive, sueur, cheveux) [83]. Quant à la SAX, son utilisation est décrite pour l'analyse d'un complexe de gadolinium spécifique, le Gd-PBMNTA [84,85]. Comme en IP ou en RP-HPLC, les séparations sont réalisées avec des phases mobiles essentiellement aqueuses dans lesquelles sont ajoutés des sels, des tampons, des agents chélatants ou des tensioactifs. Suivant les limites de détection requises, les détections UV ou ICP-MS sont mises en œuvre et aucun couplage à l'ESI-MS n'est décrit avec ces types de chromatographie.

À notre connaissance, seules deux études font mention de séparations de complexes de deux lanthanides contenant le même ligand. Ces complexes sont composés de gadolinium et de lutécium coordonnés par un ligand macrocyclique aromatique, le motexafin, et sont utilisés comme agents thérapeutiques [88,89]. Le but de ces études est de développer des méthodes de quantification spécifiques de ces complexes dans des matrices biologiques afin d'obtenir des informations pharmacocinétiques sur la dégradation et la métabolisation de ces complexes. Ces séparations ont été réalisées par RP-HPLC couplée à la spectroscopie soit UV soit à fluorescence en raison des liaisons conjuguées dans le ligand macrocyclique. À titre d'exemple, la Figure 22 présente la séparation de complexes de gadolinium et de lutécium par RP-HPLC couplée à l'UV, dans du plasma humain.



**Figure 22 : séparation de deux complexes de lanthanides, Gd-motexafin (GdTex) et Lu-motexafin (LuTex) par RP-HPLC couplé à la spectrométrie UV dans du plasma humain (colonne Zorbax Eclipse XDB-C 18 (150 x 3 mm, 3,50  $\mu$ m) ; 100 mM d'acétate d'ammonium (pH 4,3)/acétonitrile/méthanol 59/21/20 ; débit = 0,6 mL.L<sup>-1</sup>) [88]**

D'après cette figure, on peut remarquer que cette séparation nécessite une phase mobile, spécifique par rapport aux phases mobiles classiquement employées en RP-HPLC, contenant une forte proportion de solvant organique avec une concentration élevée d'acétate d'ammonium de 60 mM. De plus, la résolution et l'efficacité de cette séparation sont suffisantes pour séparer des lanthanides ayant des numéros atomiques éloignés (Gd : 64 et Lu : 71). En revanche, cette séparation semble peu adaptée pour la séparation de complexes de lanthanides ayant des numéros atomiques proches comme le samarium et le néodyme.

Dans le domaine de la séparation chromatographique d'espèces de lanthanides, l'analyse de ces composés sous forme élémentaire est extrêmement bien décrite dans la littérature. Le but de ces études est la caractérisation élémentaire et isotopique de la composition de sédiments, de roches ou de combustibles nucléaires usés. Les séparations reposent généralement sur la formation de complexes de lanthanides au cours de la séparation. À cette fin, des agents chélatants sont ajoutés dans la phase mobile. De manière plus précise, la compétition entre les différents lanthanides et l'agent chélatant est utilisée lors de séparation en IP-HPLC [90,91] ou en échanges d'ions [60,61,92] où de l'EDTA, de l'HIBA (acide hydroxyisobutyrique) ou de l'HMBA (acide 2-hydroxy-2-méthylbutyrique) sont ajoutés dans la phase mobile. Dans le cadre de notre étude sur la séparation de complexes de lanthanides, les méthodologies utilisées pour la séparation de lanthanides sous formes élémentaires ne pourront pas être transposées.

*Des méthodes analytiques ont été développées essentiellement en IP-HPLC et en RP-HPLC pour le suivi, la séparation et la quantification de complexes de gadolinium coordonnés à différents ligands polyaminocarboxyliques dans le cadre de l'étude de stabilité d'agents de contraste à base de gadolinium. Les spectroscopies à fluorescence et à UV sont principalement couplées à ces modes chromatographiques. Ces séparations ont été réalisées avec des phases mobiles essentiellement aqueuses contenant des tampons, des sels ou des agents d'appariement d'ions.*

*Au cours de cette partie, nous avons pu voir que seules certaines des espèces de gadolinium complexé à différents ligands ont été séparées en IP-HPLC et en RP-HPLC, suivant notamment leur charge ou leur hydrophobie. Dans le cadre de la séparation de complexes de différents lanthanides coordonnés par un même ligand, ces espèces étant polaires, hydrophiles et de même charge, des difficultés de séparation peuvent être attendues. Dans le cadre de l'utilisation de la détection UV, la mise en place d'une étape de dérivation post-colonne est nécessaire pour la détection de complexes transparents en UV comme ceux que l'on se propose de séparer. Ce moyen de détection n'est donc pas adapté à notre étude. De plus, les modificateurs de phase mobile en IP-HPLC et RP-HPLC comme les agents d'appariement d'ions ou les sels de phosphates ont une faible volatilité et une charge en carbone élevée. Ainsi pour le développement du couplage de l'ICP-MS et de l'ESI-MS, ces phases mobiles semblent présenter quelques inconvénients. En effet des effets de suppression de signal peuvent se produire en ESI-MS et une charge en carbone élevée peut diminuer la sensibilité en ICP-MS.*

*Dans le but de séparer les complexes de lanthanides polaires et hydrophiles, nous nous sommes intéressés à la chromatographie d'interaction hydrophile qui présente des caractéristiques en adéquation avec nos objectifs.*

## **2 Application du mode HILIC à l'analyse de spéciation des métaux et des lanthanides**

L'utilisation du mode HILIC dans le domaine de l'analyse de spéciation est très récente et de plus en plus répandue, puisque ce mode de séparation est adapté à la séparation d'espèces hydrophiles et polaires, neutres ou chargées, ce qui est généralement le cas des complexes métalliques et de lanthanides. À ce jour, les données de la littérature concernent l'analyse de la spéciation du gadolinium, des métaux de transition, des métaux lourds et des «organo-éléments» dans les domaines

environnementaux et biologiques. Les organo-éléments comme le sélénium, l'étain et l'arsenic sont des éléments se substituant à un atome de carbone ou d'azote dans une molécule organique. Ces éléments sont liés de manière covalente aux atomes d'oxygène, d'azote et d'hydrogène et les espèces contenant ces éléments sont donc plus stables que les complexes métalliques et de lanthanides.

### ***2-a) Les métaux lourds et de transition***

La spéciation de nombreux éléments, à la fois des métaux lourds et de transition comme le fer, le zinc, le cuivre, le nickel, le cadmium, le mercure et le platine, a été étudiée en HILIC, dans des matrices environnementales et biologiques. L'objectif est d'améliorer la compréhension des mécanismes de transport et d'accumulation de ces éléments dans des compartiments environnementaux et biologiques ou le suivi de la dégradation d'agents thérapeutiques. Ces éléments sont présents sous diverses formes et sont notamment complexés par divers ligands comme les acides aminés, les phytosidérophores, les métallothionéines, de petits acides carboxyliques ou des agents chélatants comme l'EDTA. Dans ce cadre, le mode HILIC couplé essentiellement à l'ESI-MS et à l'ICP-MS a été appliqué pour séparer, caractériser et parfois quantifier ces espèces métalliques mais également pour améliorer la compréhension de la rétention de ces composés en HILIC. Ces études décrivent généralement la séparation d'échantillons modèles et l'analyse de l'impact des paramètres chromatographiques sur la rétention de ces composés. Le Tableau 7 référence les paramètres chromatographiques, le type de détection associé, la nature des analytes et leur matrice associée ainsi que les méthodes de quantification employées pour l'analyse de spéciation des métaux lourds et de transition.

Espèces	Colonne <sup>1</sup>	Phase mobile	Débit (ml. min <sup>-1</sup> ) Mode	Matrice	Détection ESI- MS Modèle Analyseur	Détection ICP-MS Modèle Analyseur puissance (W) Type de chambre de nébulisation Gaz de nébulisation (L.min <sup>-1</sup> ) Oxygène (L.min <sup>-1</sup> )	Méthode de quantification	Réf.
Fe-citrate, Fe- EDTA, Cu- histidine, citrate, EDTA, histidine, autres acides aminés (chargés et neutres)	TSKgel amide 80 (150 x 2 mm ; 3 µm) ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm) Nucleodur HILIC (125 x 2 mm ; 3 µm) Luna HILIC (150 x 2 mm ; 3 µm) Kinetex PFP (100 x 2,1 mm ; 3 µm) Hypersil Gold PFP (150 x 2,1 mm ; 3 µm) Trinity P1 (100 x 2,1 mm ; 2,6 µm) Kinetex HILIC (100 x 2,1 mm ; 2,6 µm) Luna NH <sub>2</sub> (150 x 2 mm ; 3,2 µm) TSKgel-amino-100 (150 x 2 ; 3 µm)	Éluant A : ACN/H <sub>2</sub> O (90/10) + 10 mM AA pH 5,5 Éluant B : ACN/H <sub>2</sub> O (10/90) + 10 mM AA pH 5,5	0,2 Gradient	Échantillons modèles dilués dans la phase mobile	LCQ DECA Trappe ionique linéaire	Ø	Ø	[93]

	ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm)		0,125 Gradient	Extrait de feuilles	LTQ FT MS Trappe ionique linéaire couplée à un analyseur à résonance cyclotronique d'ion à transformée de Fourier		Étalonnage externe en Fe-citrate et Cu-histidine	
Fe-citrate	ZIC-pHILIC (150 x 2,1 mm ; 5 µm)	Éluant A : 10 mM AA pH 5,5 Éluant B : méthanol +10 mM AA pH 6,8	0,1 Gradient	Extrait de sèves	micrOTOF II temps de vol	Agilent 7500ce Quadripôle 1500 NS 0,9 7 %	Dilution isotopique post colonne pour la quantification du fer en ICP- MS	[94]
Fe, Ni, Cu, Zn - DMA/NA/epi- HMA, Fe-EDDHA, Fe-EDTA, DMA, NA, epi-HMA	ZIC-HILIC (150 x 1 mm ; 5 µm)	Éluant A : 10 mM AA/ACN (10/90) pH 7,3 Éluant B : 30 mM AA/ACN (80/20) pH 7,3	0,15 Gradient	Extrait de jeunes pousses et racines	LCQ DECA Trappe ionique linéaire	Ø	Ø	[95]
Fe, Ni, Cu, Zn - DMA/NA/epi- HMA, Fe-EDDHA, Fe-EDTA, DMA, NA, epi-HMA	ZIC-HILIC (150 x 1 mm ; 5 µm)	Éluant A : 10 mM AA/ACN (10/90) pH 7,3 Éluant B : 30 mM AA/ACN (80/20) pH 7,3	0,15 Gradient	Extrait de jeunes pousses et racines	LCQ DECA Trappe ionique linéaire	Ø	Ø	[39]
	ZIC-cHILIC (150 x 2,1 mm ; 3 µm)							
Al-citrate	TSK gel amide 80 (250 x 1 mm, 5 µm)	Éluant A : 10 mM AA pH 5,5 Éluant B : ACN	0,05 Gradient	Extrait de jeunes pousses, racines et feuilles	Orbitrap Velos Trappe ionique linéaire/orbitrap	Agilent 7500cs Quadripôle NS Cyclonique NS 11 %	Ø	[96]

Fe, Mn, Ca, Zn, Cu -EDTA	ZIC-HILIC (50 x 4,6 mm ; 5 µm)	ACN/H <sub>2</sub> O (70/30) + 0,1 % AF	0,5 Isocratique	Extrait d'escargot	Finnigan LTQ Orbitrap Trappe ionique linéaire/orbitrap	Ø	Étalonnage externe en Fe-EDTA	[97]
Zn; Cu, Cd, Hg- méthallothionéine	TSK gel amide 80 (250 x 1 mm; 5 µm)	Éluant A : ACN Éluant B : 5 mM AA pH 5,5	0,05 Gradient	Extrait de foie de dauphin	LTQ Orbitrap Velos Trappe ionique linéaire/orbitrap	Agilent 7500cs Quadripôle NS NS NS NS	Ø	[98]
Cis-platine, cis- platine monohydraté	ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm)	25 mM FA pH 6,5/ solvant organique (DMF, 1-propanol, ACN, DMSO) 20/80	0,1 Isocratique	Échantillons modèles dilués dans la phase mobile	Ø	Elan 6000 Quadripôle NS Cyclonique NS NS	Ø	[99]
Cis-platine, Carboplatine, Oxoplatine	LUNA NH <sub>2</sub> (150 x 1 mm ; 3 µm)	Éluant A : ACN/eau (95/5) + 0,05% AF Éluant B : ACN/eau (5/95) + 0,05% AF	0,09 Gradient	Plasma humain	Ø	Elan 6100 DRC II Quadripôle 1400 Cyclonique 0,8 30 mL.min <sup>-1</sup>	Ø	[100 ]
Cis-platine, cis- platine monohydraté	ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm ; 5 µm)	DMF/(20 mM AA) (70/30)	0,1 Isocratique	Cellules de mélanome humain	Ø	Elan 6000 Quadripôle NS Cyclonique 1,1 NS	Ø	[101 ]

Cis-platine, cis-platine monohydraté cis-platine dihydraté	ZIC-HILIC (NS x 2,1 mm ; NS)	Éluant A : n-propanol / 20 mM FA pH 4 (95/5) Éluant B : n-propanol / 20 mM FA pH 4 (50/50) Éluant C : 100 mM FA pH 4	0,3 Gradient	Effluents d'hôpitaux	Ø	Agilent 7700 x Quadripôle 1600 W Scott 0,67 9 %	Dilution isotopique post colonne pour la quantification du platine	[102 ]
--	------------------------------	---	-----------------	-------------------------	---	--	--	-----------

<sup>1</sup> Les groupements fonctionnels des colonnes présentées sont précisés ci après :

Nucleodur HILIC : groupements zwitterionique sulfobétaïne ; LUNA HILIC : groupements diol réticulé ; Trinity P1 : groupements échangeurs d'anions et de cations ; Kinetex HILIC : silice vierge non fonctionnalisée ; Hypersil Gold PFP et Kinetex PFP : groupements pentafluorophényle ; ZIC-HILIC : groupements zwitterionique sulfobétaïne ; LUNA NH<sub>2</sub> et TSKgel-amino-100 : groupements amine ; TSK gel amide 80 : groupements carbamoyl ; ZIC-chILIC : groupements zwitterionique phosphorylcholine ; ZIC-pHILIC : groupements zwitterionique sulfobétaïne à support de greffage polymérique

**Tableau 7 : bilan des études de spéciation des métaux lourds et de transition par HILIC. DMF : diméthyleformamide ; DMSO : diméthylsulfoxyde ; DMA : acide 2'-déoxymugineïque ; NA : nicotianamine ; MA : acide mugineïque ; epi-HMA : acide 3-épi-hydroxymugineïque ; EDDHA : acide éthylènediamine-N,N'-bis(o-hydroxyphényle)acétique ;**

**AF : acide formique ; AA : acétate d'ammonium ; FA : formate d'ammonium ; Ø absence de méthode de quantification**



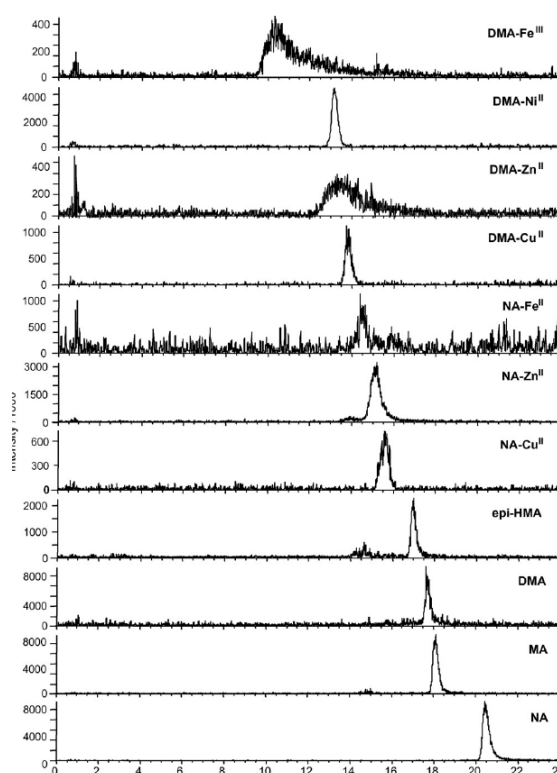
Comme indiqué précédemment, les études présentées dans le Tableau 7 ont pour but le suivi, l'identification et la quantification de complexes métalliques. Elles ont, dans certains cas, pour objectif l'étude de l'influence des paramètres chromatographiques sur la séparation de ces composés en raison de l'essor de l'analyse de spéciation en HILIC. Köster *et al.* ont ainsi réalisé une comparaison de nombreuses phases stationnaires pour la séparation de complexes de fer et de cuivre afin de mieux appréhender les mécanismes de séparation en HILIC [93]. Il ressort de cette étude que les phases stationnaires engendrant des interactions électrostatiques trop fortes comme les phases stationnaires en silice vierge et à fonctions amines ou à fonctions échangeuses d'ions, ont tendance à provoquer la dissociation des complexes. Par ailleurs, les phases stationnaires fonctionnalisées par des groupements moins polaires comme les fonctions pentafluorophényle ne permettent pas leur rétention. En revanche, les phases stationnaires à fonctions amide, zwitterionique sulfobétaïne et diol réticulé ont permis la rétention et la séparation de complexes de métaux avec différentes sélectivités. D'après le Tableau 7, de nombreuses phases stationnaires ont été utilisées pour la séparation des complexes métalliques en raison de la diversité des espèces à séparer. En effet, les études présentent généralement la séparation de complexes de plusieurs métaux coordonnés à différents ligands et de ces mêmes ligands libres. Les méthodes de séparation nécessitent ainsi des phases stationnaires induisant une sélectivité élevée. Malgré cette diversité de phases stationnaires, les phases stationnaires à fonctions zwitterionique sulfobétaïne sont majoritairement utilisées. Ce choix est dû au fait que ces phases stationnaires engendrent des interactions électrostatiques faibles permettant de ne pas provoquer la dissociation des complexes. Les complexes métalliques étudiés sont souvent labiles comme les complexes Fe-citrate ou Cu-histidine ou présentent des cinétiques de dissociation rapide comme les complexes Zn-Hg-métallothionéine.

Les séparations présentées dans les études du Tableau 7 sont réalisées en mode gradient en raison de la diversité de la polarité des espèces [39,93,95,98,100,102]. Les phases mobiles sont essentiellement composées d'acétonitrile sauf pour la séparation des complexes de platine en raison de la dégradation de ces complexes par l'acétonitrile. L'impact de l'utilisation de solvants alternatifs a donc été étudié dans ce cas [99].

Pour la quantification de complexes métalliques, le couplage HILIC ICP-MS est principalement reporté [93,94,102] sauf pour une étude où le couplage HILIC ESI-MS a été utilisé [97]. Le couplage HILIC ESI-MS est majoritairement employé pour la

caractérisation structurale de complexes métalliques inconnus dans diverses matrices [39,93-96,98]. Par ailleurs le couplage HILIC ICP-MS est parfois utilisé de manière complémentaire au couplage HILIC ESI-MS, afin de confirmer la présence d'éléments au sein des complexes métalliques caractérisés par ESI-MS [94,96,98].

La Figure 23 présente la séparation et l'identification de métaux (Fe, Ni, Zn, Cu) coordonnés par des phytosidérophores par HILIC ESI-MS dans des matrices environnementales.



**Figure 23 : séparation de complexes de métaux par HILIC ESI-MS avec une phase stationnaire à fonctions zwitterioniques**

**DMA : acide 2'-déoxymuginéique ; NA : nicotianamine ; MA : acide muginéique ; epi-HMA : acide 3-epi-hydroxymuginéique [95] (conditions voir Tableau 7)**

D'après la Figure 23, on peut remarquer que malgré le fait que les complexes métalliques d'un même ligand (Ni-DMA, Cu-DMA, Zn-DMA) soient co-élués, le spectromètre de masse ESI-MS permet d'extraire la masse spécifique de chaque complexe et ainsi de les identifier lors de leur analyse.

*L'analyse de spéciation des métaux lourds et de transition a été principalement réalisée dans le but d'identifier et de caractériser des espèces métalliques dans diverses matrices. Bien que l'utilisation d'une diversité de phases stationnaires soit décrite, la phase stationnaire à fonctions zwitterioniques est majoritairement employée. Quand l'objectif principal de ces études est l'identification et la caractérisation d'espèces inconnues ou ciblées, le couplage HILIC ESI-MS est souvent reporté. Le couplage HILIC ICP-MS permet de détecter et de quantifier les éléments au sein des complexes de coordination ciblés mais ne permet pas d'en donner la structure. Les deux types de spectrométrie de masse sont donc souvent utilisés de manière complémentaire.*

## **2-b) Les organo-éléments**

L'analyse de spéciation des organo-éléments en mode HILIC a été réalisée pour les espèces de sélénium, d'arsenic et d'étain. Les études de spéciation du sélénium ont pour but l'identification et la caractérisation de nouvelles espèces contenant du sélénium dans des matrices diverses comme des céréales, des compléments alimentaires ou des levures séléniées. Pour l'analyse de spéciation de l'arsenic, l'objectif des études est le suivi et la quantification des organoarséniés dans des matrices de type organismes marins mais également l'étude fondamentale de leur comportement par chromatographie en mode HILIC. Les espèces contenant de l'étain ont été étudiées par HILIC pour suivre et quantifier des polluants anthropogéniques dans une matrice d'eau de mer.

Le Tableau 8 et le Tableau 9 recensent les études concernant les méthodes de séparation par HILIC relatives respectivement aux espèces de sélénium et d'arsenic. Les paramètres chromatographiques, le type de détection associé, la nature des échantillons et leur matrice ainsi que les méthodes de quantification employées y sont également présentés.

Colonne <sup>1</sup>	Phase mobile	Débit (ml. min <sup>-1</sup> ) Mode	Matrice	Détection ESI-MS Modèle Analyseur	Détection ICP-MS Modèle Analyseur puissance (W) Type de chambre de nébulisation Gaz de nébulisation (L.min <sup>-1</sup> ) Oxygène (L.min <sup>-1</sup> )	Espèces	Réf.
TSK gel amide 80 (250 x 4,6 mm ; 5 µm)	Éluant A : ACN+ 0,1 % TFA Éluant B : H <sub>2</sub> O+ 0,1 % TFA	0,8 Gradient	Levures sélénisées	LTQ Orbitrap Trappe ionique linéaire/orbitrap	Ø	Sélénopeptides	[103]
TSK gel amide 80 (250 x 1 mm ; 5 µm)	Éluant A : ACN Éluant B : 10 mM AA pH 5	0,05 Gradient	Céréales (riz, maïs, blé)	LTQ Orbitrap Trappe ionique linéaire/orbitrap	Ø	Sélénopeptides , sélénosucres, Oxyde de sélénium	[104]
TSK gel amide 80 (250 x 4,6 mm ; 5 µm)	Éluant A : ACN+ 0,1 % TFA Éluant B : H <sub>2</sub> O+ 0,1 % TFA	0,8 Gradient	Levures sélénisées	LTQ Orbitrap Trappe ionique linéaire/orbitrap	Elan 6000 Quadrupole NS NS NS NS	Sélénopeptides	[105]
TSK gel amide 80 (250 x 1 mm ; 5 µm)	ACN/H <sub>2</sub> O (80/20) + 1 mM AA + 10 mM acide acétique	0,05 Isocratique	Levures sélénisées	Qstar XL Quadrupôle/ temps de vol	Elan 6000 Quadrupôle 1200 NS 0,9 35 mL.min <sup>-1</sup>	Sélénopeptides	[106]

TSK gel amide 80 (250 x 1 mm ; 5 µm)	Éluant A : ACN Éluant B : 10 mM AA pH 5	0,05 Gradient	Sang et urine humain	LTQ Orbitrap Velos Trappe ionique linéaire/orbitrap	7500cs Quadripôle NS NS NS NS	Sélénopeptides , sélénosucres	[107]
TSK gel amide 80 (250 x 1 mm ; 5 µm)	Éluant A : ACN Éluant B : 10 mM FA pH 5,5	0,05 Gradient	Graines	LTQ Orbitrap Trappe ionique linéaire/orbitrap	7500cs Quadripôle NS NS NS NS	Sélénopeptides , sélénométabo- lites	[108]

<sup>1</sup> Les groupements fonctionnels des colonnes présentées sont précisés ci après : TSK gel amide 80 : groupements carbamoyle.

**Tableau 8 : bilan des études de spéciation du sélénium par HILIC ; TFA : acide trifluoroacétique ; AA : acétate d'ammonium ; FA : formate d'ammonium**

Dans le cadre de l'analyse de spéciation du sélénium, les études présentées dans le Tableau 8 ont pour objectif l'identification et la caractérisation structurale de nouveaux sélénopeptides ou de nouveaux sélénosucres dans diverses matrices (levures, céréales, urine). L'utilisation de l'HILIC intervient alors dans des stratégies que l'on retrouve classiquement en protéomique. Dans ces stratégies, une première étape de récupération de fraction par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est réalisée. Les fractions sont ensuite analysées par des modes chromatographiques orthogonaux, la RP-HPLC ou par chromatographie d'échange d'ions (IC) et l'HILIC. L'utilisation de deux modes orthogonaux permet la séparation et l'identification d'une plus large gamme de composés.

Les phases stationnaires utilisées pour la séparation des organoséléniés par HILIC sont les phases stationnaires à fonctions amide, qui sont les phases les plus employées en protéomique. Comme l'indique le Tableau 8, les séparations chromatographiques des organoséléniés sont toujours couplées à l'ESI-MS à haute résolution de type hybride (trappe linéaire/orbitrap ou quadripôle/temps de vol) afin de déterminer la masse exacte des espèces détectées avec une précision de l'ordre de la centaine de ppt [103-108]. Afin d'aider à l'analyse des données de masse à haute résolution et de confirmer la présence de sélénium au sein des espèces, la chromatographie en mode HILIC a été couplée à l'ICP-MS dans certaines études [105-108]. D'après le Tableau 8, les analyses sont réalisées en mode gradient afin de séparer une large gamme de composés de polarités différentes. Aucune de ces études ne décrit la mise au point de méthode de quantification des analytes.

Dans le cadre de l'analyse de spéciation de l'arsenic, seules trois études sont décrites dans la littérature et sont présentées dans le Tableau 9.

Colonne <sup>1</sup>	Phase mobile	Débit (ml. min <sup>-1</sup> )	Matrice	Détection ESI-MS Modèle Analyseur	Détection ICP-MS Modèle Analyseur puissance (W) Type de chambre de nébulisation Gaz de nébulisation (L.min <sup>-1</sup> ) Oxygène (L.min <sup>-1</sup> )	Espèces	Méthode de quantification	Réf.
ZIC-HILIC 150 x 2,1 ; 3,5 µm	ACN/H <sub>2</sub> O ((85/15) ou (75/25)) + AA (0 à 37,5 mM) + FA ((0 à 37,5 mM) pH (4,5-8)	Débit variable (0,05-0,5) Isocratique	Échantillons modèles dilués dans la phase mobile Muscle de poisson	MSD 6130 Quadripôle	7500ce Quadripôle 1600 Scott 0,4 9%	Arséno- métabolites	Ø	[109 ]
ZIC-HILIC 150 x 2,1 ; 3,5 µm	Éluant A : AA 125 mM Éluant B : acétonitrile	0,1 Gradient	Échantillons modèles diluée dans la phase mobile	MSD 6130 Quadripôle	7500ce Quadripôle 1600 Scott 0,4 9%	Arséno- métabolites	Étalonnage externe en HILC ICP-MS de l'arsénobétaïne	[110 ]
LUNA HILIC 150 x 2,0 mm ; 3 µm	ACN/H <sub>2</sub> O (90/10) + 5 mM FA pH 3	0,4 Isocratique	huîtres	Agilent 6410 Triple Quadripôle	Ø	Arsénobétaïne	Dilution isotopique spécifique ( <sup>13</sup> C)	[111 ]

<sup>1</sup> Les groupements fonctionnels des colonnes présentées sont précisés ci-après : LUNA HILIC : groupements diol réticulés ; ZIC-HILIC : groupements zwitterionique sulfobétaïne

**Tableau 9 : bilan des études de spéciation de l'arsenic par HILIC ; TFA : acide trifluoroacétique ; AA : acétate d'ammonium ; FA : formate d'ammonium**

Comme indiqué précédemment, les études présentées dans le Tableau 9 ont pour objectif le suivi et la quantification des organoarséniés dans des organismes marins (huîtres, poissons...). Si les formes inorganiques de l'arsenic sont toxiques, les formes organiques ou organoarséniés sont essentielles pour certains mammifères. Ainsi la mesure de l'arsenic total n'est pas suffisante et il est nécessaire de développer des méthodes de séparation des espèces d'arsenic.

Comme le montre le Tableau 9, la séparation des métabolites de l'arsenic a été réalisée avec des phases stationnaires à fonctions zwitterioniques [109,110] ou diol réticulé [111]. Ces trois études sont également focalisées sur la validation de la méthode de quantification à l'aide de matériaux de référence certifiés. Dans cette optique, une de ces études porte sur la mise au point d'une méthode de quantification par couplage HILIC ESI-MS/MS par dilution isotopique à traçage spécifique [111]. Une espèce contenant de l'arsenic marquée isotopiquement au carbone 13 a été introduite dans l'échantillon en tant que traceur de l'analyte ciblé. Cette méthode de quantification a permis d'atteindre les valeurs de référence avec la précision requise, inférieure à 5%. Dans les autres études présentées dans le Tableau 9 [109,110], la mise au point d'un couplage simultané de l'HILIC à l'ESI-MS et l'ICP-MS a été réalisée afin d'atteindre les performances analytiques requises, en termes d'incertitudes et de justesse, pour la quantification d'un échantillon de référence certifié. Ces études seront décrites plus précisément dans le paragraphe 3.

Dans le cadre de l'analyse de spéciation de l'étain, une étude a été réalisée par HILIC couplée à l'ESI-MS pour séparer et quantifier des organostanniques, le triphénylétain (TPT) et le tributylétain (TBT), dans une matrice d'eau de mer [112]. Cette étude est la seule reportée pour l'analyse des organostanniques en mode HILIC. En effet, leur analyse est habituellement réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), précédée d'une étape de dérivation afin d'augmenter leur volatilité. Les séparations par GC-MS étant considérées complexes et longues par les auteurs, cette étude décrit la mise au point d'une méthode d'analyse rapide et précise de ces organostanniques par chromatographie en mode HILIC. Des limites de détection de l'ordre de la ppt pour le TPT et le TBT dans l'eau de mer ont été obtenues après une étape préalable d'extraction sur phase solide.



*L'analyse de spéciation du sélénium a été réalisée pour caractériser de nouvelles espèces contenant du sélénium dans des matrices complexes, essentiellement par couplage HILIC ESI-MS à haute résolution. Afin d'aider à la détection des organosélénés, le couplage HILIC ICP-MS est utilisé de manière complémentaire au couplage HILIC ESI-MS. La phase stationnaire à fonctions amide est essentiellement reportée pour la séparation par chromatographie en mode HILIC des espèces. L'analyse de spéciation de l'arsenic par HILIC est décrite pour la quantification d'organoarsénés dans les organismes marins en couplage avec l'ICP-MS. La stabilité de ces espèces fait que des matériaux de références certifiées en organoarsénés sont disponibles, ce qui permet la validation des méthodes de quantification. La mise au point d'un couplage simultané de l'HILIC à l'ESI-MS et l'ICP-MS a été réalisée pour l'étude des organoarsénés et sera présentée dans le paragraphe 3.*

### **2-c) Les lanthanides**

Dans la famille des lanthanides, seule la spéciation du gadolinium a été étudiée dans le cadre du suivi et de la quantification d'agents de contraste à base de gadolinium dans les milieux biologiques et environnementaux. Comme précisé précédemment, leur utilisation intensive est à l'origine du développement de nombreuses méthodes chromatographiques. Bien qu'initialement la RP-HPLC et l'IP-HPLC aient été mises en œuvre, le mode HILIC s'est avéré une approche de choix pour ces études en raison de ses caractéristiques. Le Tableau 10 présente l'ensemble des études, relativement récentes, concernant la spéciation du gadolinium par chromatographie en mode HILIC. Le Tableau 10 référence également les paramètres chromatographiques, le type de détection associée, la nature des échantillons et leur matrice associée ainsi que les méthodes de quantification employées.

Colonne	Phase mobile	Débit (ml. min <sup>-1</sup> )	Matrice	Détection ESI-MS Modèle Analyseur	Détection ICP-MS Modèle Analyseur puissance (W) Type de chambre de nébulisation Gaz de nébulisation (L.min <sup>-1</sup> ) Oxygène (L.min <sup>-1</sup> )	Espèces	Méthode de quantification	Réf.
Accucore (150 x 3 mm ; 2,1 µm)	ACN/(25 mM AA pH 7,4) (70/30)	0,25 Isocratique	Sang humain	Orbitrap Exactive Quadripôle-orbitrap	iCAP Qc Quadripôle 1550 Cyclonique 0,9 0,035	Gd-DTPA, Gd-DOTA, Fe-DTPA, Fe-DOTA	Étalonnage externe avec ICP-MS en Gd-DTPA, Gd-DOTA, Fe-DTPA, Fe-DOTA	[113]
Accucore (150 x 3 mm ; 2,1 µm)	ACN/(50 mM FA pH 3,75) (70/30)	0,250 Isocratique	Eaux de rivière	Ø	ElementXR Secteur magnétique 1500 Scott/Apex 0,8 0,07/0,035	Gd-DTPA, Gd-BOPTA, Gd-DOTA, Gd-BT- DO3A	Étalonnage externe avec ICP-MS en Gd- DTPA, Gd-BOPTA, Gd- DOTA, Gd-BT-DO3A	[114]
ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm; 3,5 µm)	ACN/(50mM FA pH 3.75) (70/30)	0,3 Isocratique	Eaux et boues de station d'épuration	MicrOTOF Temps de vol Orbitrap Exactive Quadripôle-orbitrap	ElementXR Secteur magnétique 1500 Cyclonique 0,8 0,07	Gd-DTPA, Gd-DTPA- BMA, Gd-BOPTA, Gd-DOTA, Gd-BT- DO3A	Étalonnage externe avec ICP-MS en Gd-DTPA, Gd-DTPA- BMA, Gd-BOPTA, Gd- DOTA, Gd-BT-DO3A	[115]
Accucore (150 x 3 mm ; 2,1 µm)		0,25 Isocratique						

ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm)	ACN/H <sub>2</sub> O + 12,5 mM FA +12,5 mM AF pH 3.75 (76/24)	0,3 Isocratique	Effluents d'hôpitaux Eaux usées Eaux de station d'épuration	Ø	Elan 600 Quadripôle 1400 Cyclonique 0,45 0,1	Gd-DTPA, Gd-DTPA- BMA, Gd-BOPTA, Gd-DOTA, Gd-BT- DO3A	Étalonnage externe en Gd- DTPA, Gd-DTPA-BMA, Gd-BOPTA, Gd- DOTA, Gd-BT-DO3A	[116]
ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm)	Éluant A : H <sub>2</sub> O/ACN (76/24) + 12,5 mM FA +12,5 mM AF pH3,75 Éluant B : ACN/H <sub>2</sub> O (76/24) + 12,5 mM FA +12,5 mM AF pH 3,75	0,3 Gradient	Sang humain	API 2000/QTRAP Triple Quadripôle/ trappe ionique linéaire	Ø	Gd-DTPA, Gd-DTPA- BMA, Gd-BOPTA, Gd-DOTA, Gd-BT- DO3A	Étalonnage interne avec DTPA-Eu pour la quantification du Gd-DTPA et du Gd-BT-DO3A	[117]
ZIC-HILIC (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm)	ACN/H <sub>2</sub> O (60/40) + 20 mM AA pH 5,8	0,1 Isocratique	Eaux de rivière	Ø	7500cx Quadripôle 1500 NS 1,1 15%	Gd-DTPA, Gd-DTPA- BMA, Gd-BOPTA, Gd-DOTA, Gd-BT- DO3A	Étalonnage externe en gadolinium	[118]
ZIC-HILIC (250 x 2,1 mm ; 5 µm)	ACN/H <sub>2</sub> O (65/35) + 20 mM AA pH 7,3	0,15 Isocratique	Eaux de surface et plantes	Ø	7500cs Quadripôle 1500 Scott 0,75 15%	Gd-DTPA, Gd-DTPA- BMA, Gd-BOPTA, Gd-DOTA, Gd-BT- DO3A	Étalonnage externe en Gd- DTPA, Gd-DTPA-BMA, Gd-BOPTA, Gd- DOTA, Gd-BT-DO3A	[119]

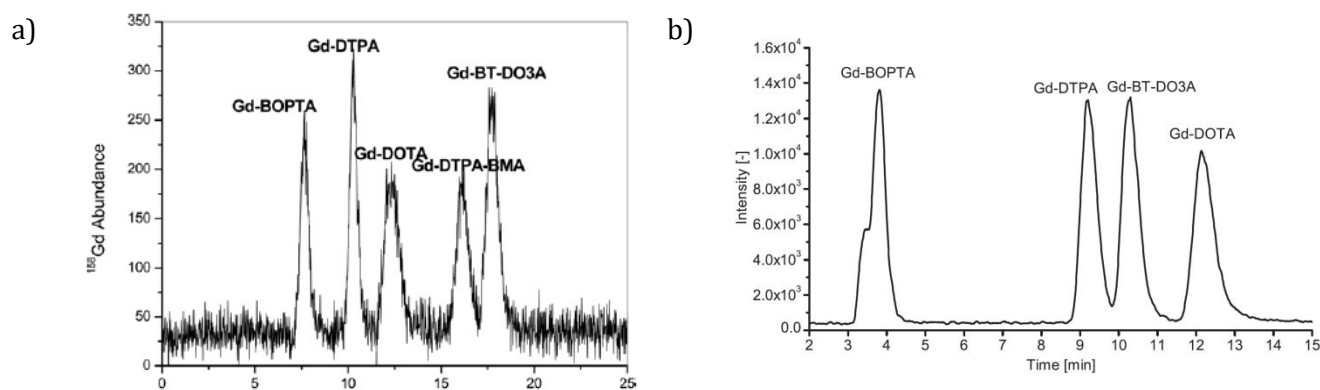
ZIC-cHILIC (250 x 2,1 ; 3 µm)	ACN/H <sub>2</sub> O (69/31) + 10 mM AA pH 5	0,2 isocratique	Eaux du robinet	Ø	ICAP-Q Quadripôle 1550 Cyclonique 0,5-0,7 0,4	Gd-DTPA, Gd-DTPA- BMA, Gd-BOPTA, Gd-DOTA, Gd-BT- DO3A	Étalonnage interne en Pr-DOTA	[120]
----------------------------------	---	--------------------	--------------------	---	--	---	-------------------------------------	-------

<sup>1</sup> Les groupements fonctionnels des colonnes présentées sont précisés ci après : ZIC-HILIC : groupements zwitterionique sulfobétaïne ; ZIC-cHILIC : groupements zwitterionique phosphorylcholine ; ACCUCORE : silice vierge non fonctionnalisée.

**Tableau 10 : bilan des études de spéciation du gadolinium par HILIC. Les formules des différentes espèces de gadolinium sont présentées en annexe 1.**

D'après le Tableau 10, les phases stationnaires utilisées pour les mises au point de la séparation de complexes de gadolinium coordonnés à différents ligands sont soit fonctionnalisées par des groupements zwitterioniques de type sulfobétaïne [115-120] soit composées de silice vierge à particules superficiellement poreuses [113-115]. Comme cela a été précisé dans les paragraphes précédents, la phase stationnaire à fonctions zwitterioniques est classiquement employée en analyse de spéciation du fait des faibles interactions entre la phase stationnaire et les analytes. La phase stationnaire à particules superficiellement poreuses est composée de silice vierge et présente de faibles résistances à l'écoulement et des transferts de masse rapides, ce qui permet des séparations plus rapides qu'avec d'autres colonnes analytiques, mais restant efficaces.

La séparation d'agents de contraste par HILIC ICP-MS avec (a) une phase stationnaire poreuse à fonctions zwitterioniques [118] et (b) une phase stationnaire de silice vierge à particules superficiellement poreuses [114] est illustrée Figure 24, à titre d'exemple :



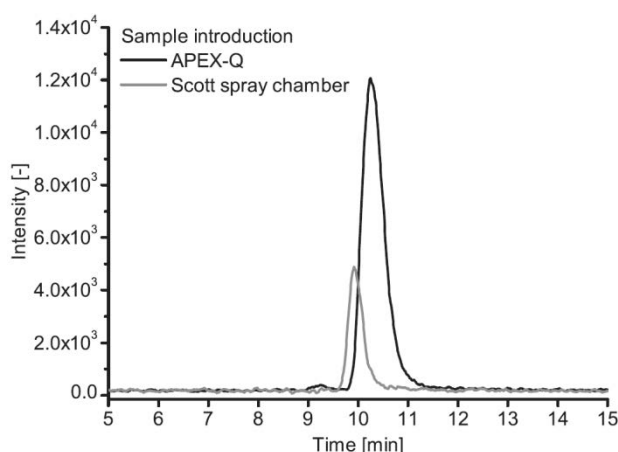
**Figure 24 : séparation d'agents de contraste par HILIC ICP-MS a) avec une phase stationnaire zwitterionique (conditions voir Tableau 10 [118]) b) avec une phase stationnaire de silice vierge à particules superficiellement poreuses (conditions voir Tableau 10 [114]). Les structures des complexes sont présentées en annexe 1**

D'après la Figure 24, on peut observer que, comme attendu, différentes sélectivités sont obtenues suivant les phases stationnaires utilisées. Concernant le Gd-BOPTA, il n'est pas retenu avec la phase stationnaire en silice vierge en raison de la forte polarité de cette phase stationnaire et de la présence d'un cycle aromatique dans le ligand BOPTA. Par ailleurs, l'ordre d'élution dépend également de la phase stationnaire utilisée et des interactions entre celle-ci et les analytes.

Les données du Tableau 10 montrent également que les séparations ont été principalement réalisées en conditions d'élution isocratique, en utilisant des phases mobiles composées majoritairement d'acétonitrile, de 60 à 76%, et avec une concentration en sels, acétate ou formate d'ammonium, de 7,5 à 20 mM. Un gradient de

phase mobile a été mis en place dans une seule étude [117] et donne lieu à la même séparation qu'en mode isocratique [116]. Les pourcentages d'acétonitrile dans la phase mobile sont toujours inférieurs à 80 %, ce qui représente des pourcentages faibles en mode HILIC où les pourcentages d'acétonitrile sont classiquement supérieurs pour la rétention de molécules organiques [24,25,27].

L'objectif principal des études présentées dans le Tableau 10 étant le suivi et la quantification d'agents de contraste à base de gadolinium, le couplage du mode HILIC avec l'ICP-MS a été le plus développé. L'ICP-MS est une technique d'analyse spécifique et très sensible, permettant de mesurer de très faibles niveaux de concentration ( $10^{-11}$  mol.L<sup>-1</sup> en Gd avec un ICP-Q-MS) et d'obtenir des méthodes de quantification justes et robustes. Des précautions classiques liées à l'introduction de solvant organique dans le plasma ont été prises. Afin d'éviter le dépôt de carbone sur les cônes des interfaces, de l'oxygène a été ajouté dans le gaz auxiliaire pour oxyder le carbone en CO<sub>2</sub>. De plus, la chambre de nébulisation a été refroidie par effet Peltier afin de condenser les vapeurs de solvant organique. Une étude peut également être citée pour la mise en place d'un désolvateur de type APEX comme système d'introduction de l'échantillon [114]. Ce désolvateur permet de condenser une grande partie du solvant de transport (jusqu'à 95 %) et d'obtenir un aérosol sec. Dans cette étude, l'utilisation de ce système d'introduction a permis une diminution de l'oxygène introduit dans le gaz auxiliaire de 0,07 mL.min<sup>-1</sup> à 0,035 mL.min<sup>-1</sup>. La Figure 25 présente la comparaison des signaux obtenus avec l'utilisation d'une chambre de nébulisation classique de type Scott et le désolvateur APEX.

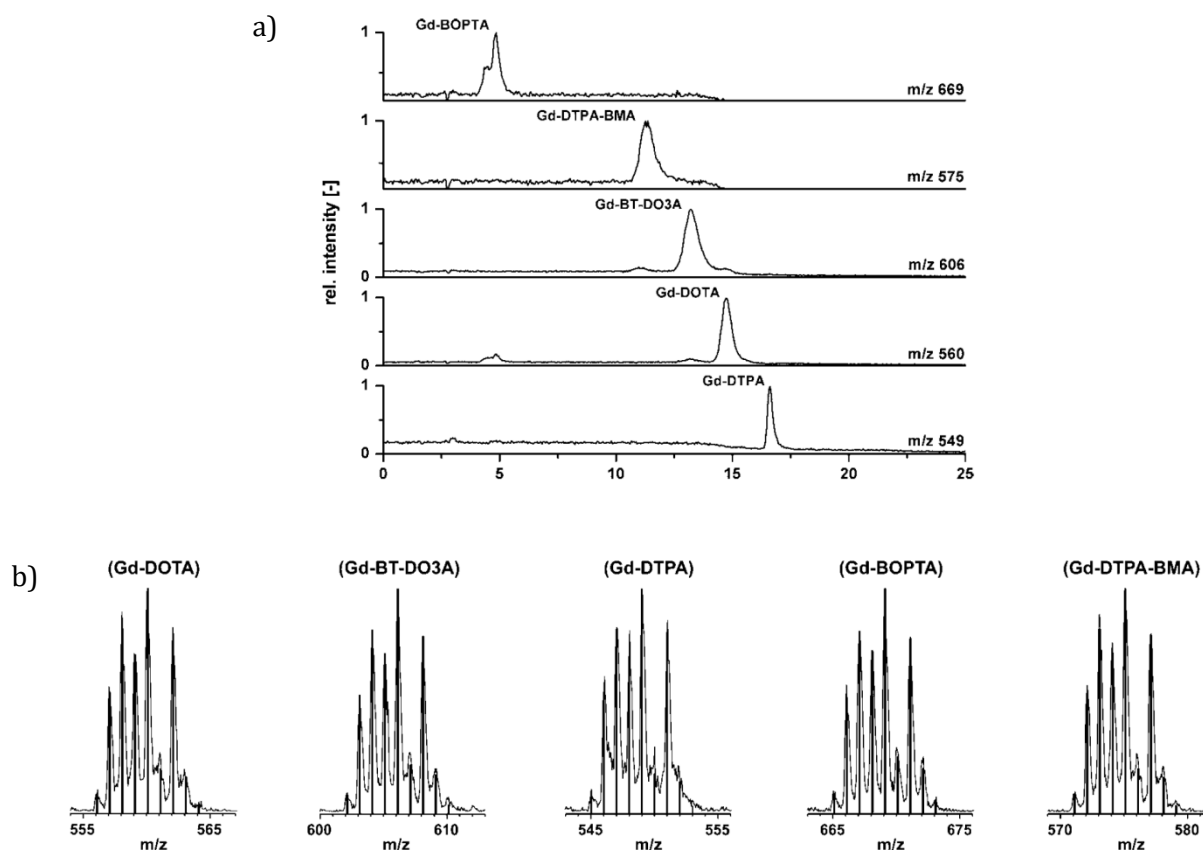


**Figure 25 : comparaison des signaux du Gd-BT-DO3A (annexe 1) obtenus par HILIC ICP-MS  $c=10$  nmol.L<sup>-1</sup>) en utilisant une chambre de nébulisation de Scott (gris) et un désolvateur (noir) (condition de séparation voir Tableau 10 [114])**

Comme le montre la figure 5, un gain de sensibilité, d'un facteur proche de 3, a été obtenu en utilisant ce désolvateur comparé à une chambre de nébulisation classique lors l'élution d'un complexe de gadolinium (Gd-BT-DO3A, annexe 1). Ce gain est dû à l'amélioration de l'efficacité du transport des analytes jusqu'au plasma et à la réduction de la charge de solvant associée.

Dans les études présentées dans le Tableau 10, le couplage du mode HILIC avec l'ESI-MS a été moins développé et est généralement mis en œuvre en complément du couplage HILIC ICP-MS pour l'optimisation des conditions de séparation et pour l'identification des complexes de gadolinium dans les échantillons réels [113,115].

À notre connaissance, seule une étude portant sur la quantification, par HILIC, de complexes de gadolinium, utilisés comme agents de contraste, a été développée [117]. Cette étude repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire zwitterionique pour la séparation du Gd-DTPA, du Gd-DTPA-BMA, du Gd-BOPTA, du Gd-DOTA et Gd-BT-DO3A (structures en annexe 1) en mode gradient. La distribution isotopique caractéristique du gadolinium permet l'identification d'espèces contenant ce lanthanide par ESI-MS. Dans cette étude, l'utilisation du mode MRM (*multiple reaction monitoring*), permettant un suivi spécifique et sélectif pour la quantification du Gd-DTPA et du Gd-BT-DO3A, n'a pas pu être mise en œuvre à cause d'une perte de sensibilité importante. Une méthode de quantification par un étalonnage interne a été mise au point en utilisant un complexe d'euprimum (Eu-DTPA). La limite de détection la plus faible obtenue est de  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> pour le Gd-BT-DO3A et le Gd-DOTA. La Figure 26 présente le chromatogramme de la séparation de complexes de gadolinium ainsi que les spectres de masse obtenus pour chaque espèce préalablement séparée.



**Figure 26 : a) séparation de complexes de gadolinium (courant d'ion extrait) (conditions chromatographiques voir Tableau 10 [117]) b) spectres de masse de chaque complexe séparé (enveloppe) avec leur spectre théorique (bâtonnet)**

On peut constater que l'ensemble des complexes de gadolinium sont séparés (Figure 26a). En revanche, comme on peut le remarquer sur un autre chromatogramme non reproduit ici, l'étalon d'Eu-DTPA, utilisé dans cette étude, est co-élué avec le Gd-DTPA. Concernant les spectres de masse, la répartition isotopique expérimentale est en adéquation avec celle théorique, malgré une résolution pouvant être améliorée.

Une étude peut également être citée pour l'utilisation d'un étalon interne de Pr-DOTA pour la quantification de complexes de gadolinium par HILIC ICP-MS dans l'eau du robinet [120]. Contrairement à l'étude par HILIC ESI-MS précédemment citée, l'étalon interne de Pr-DOTA a été partiellement séparé des autres complexes de gadolinium en particulier du Gd-DOTA avec une phase stationnaire à fonctions zwitterioniques phosphorylcholine. Cela montre que, comme attendu, la phase stationnaire à fonctions zwitterioniques sulfobetaine, utilisée pour l'étude en HILIC ESI-MS et la phase stationnaire à fonctions zwitterioniques phosphorylcholine, utilisée pour l'étude en HILIC ICP-MS, n'induisent pas la même sélectivité.



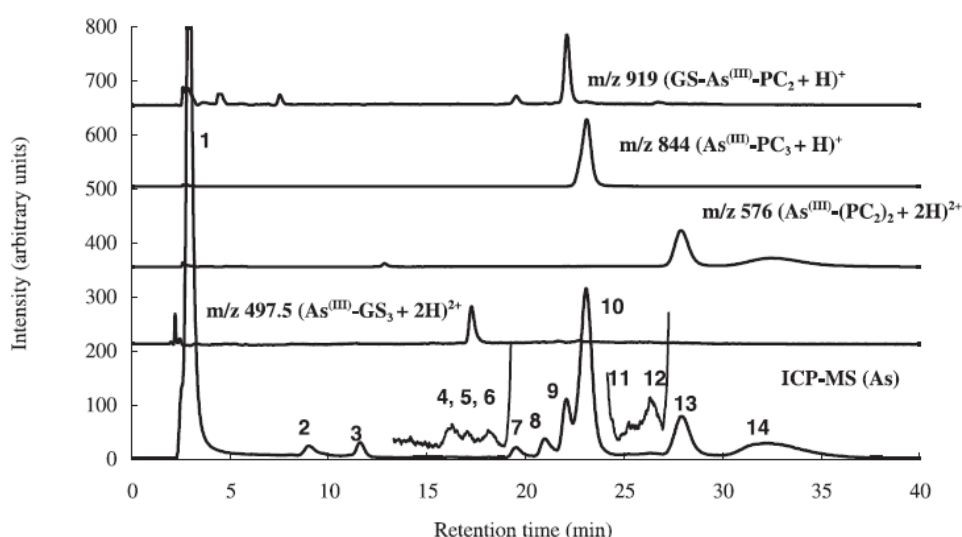
*Dans le domaine de l'analyse de spéciation des lanthanides par chromatographie en mode HILIC, seule la séparation d'agents de contraste à base de gadolinium a été étudiée. Pour leur séparation, seulement deux phases stationnaires en silice vierge et à fonctions zwitterioniques ont été utilisées. Le suivi et la quantification de ces complexes de gadolinium coordonnés à différents ligands polyaminocarboxyliques dans diverses matrices a été principalement réalisé par HILIC ICP-MS. Le couplage HILIC ESI-MS a été mis en œuvre en complément des études par HILIC ICP-MS pour la mise au point de la séparation et l'identification des complexes. Une seule méthode de quantification des complexes de gadolinium par couplage HILIC ESI-MS est reportée. Aucune étude ne décrit la séparation de différents complexes de plusieurs lanthanides par HILIC, ce qui constitue l'un des objectifs du développement de notre méthode d'analyse de spéciation des lanthanides.*

### **3 Analyse de spéciation par différents types de chromatographies couplées simultanément à l'ESI-MS et l'ICP-MS**

Le couplage d'une méthode de séparation chromatographique simultanément à l'ESI-MS et l'ICP-MS dans le cadre de l'analyse de spéciation a été envisagé pour la première fois en 1998 par R.S. Houk [121]. Dans son étude, l'auteur expose comment ces deux spectrométries, dont les conditions opératoires sont *a priori* peu compatibles, peuvent permettre d'obtenir en une seule analyse des données complémentaires d'identification moléculaire d'une part et de caractérisation élémentaire et isotopique d'autre part. Bien que de nombreuses études décrivent le couplage de techniques séparatives individuellement avec l'ESI-MS et l'ICP-MS [122-124], il n'a que rarement été réalisé de manière simultanée. Cette partie décrit les mises au point des couplages simultanés d'une séparation chromatographique avec l'ESI-MS et l'ICP-MS pour l'analyse pour spéciation.

Dans le cadre de la spéciation de l'arsenic dans des matrices environnementales, une équipe a développé un couplage simultané de la RP-HPLC à l'ESI-MS et à l'ICP-MS [125-130]. Ces études ont pour but la détection et la quantification complexes d'arsenic à ligands peptidiques. Les phases stationnaires utilisées dans ces études sont fonctionnalisées par des groupements octadécyle et la phase mobile est composée d'un gradient eau-méthanol avec 1% ou 0,1% d'acide formique. La mise au point du couplage

tout comme le diviseur de flux employé n'ont jamais été décrits. Le rapport de split est de 1 : 4 ICP-MS : ESI-MS. Dans ces études, les auteurs ont focalisé leur développement sur la détection ICP-MS, leur but étant d'atteindre des limites de détection les plus faibles possibles. Pour cela, l'utilisation d'une cellule de collision avec de l'oxygène pour limiter les interférences isobariques de l'arsenic ou encore d'un système de désolvatation par membrane (Aridus) a été décrite. Dans le cas de l'utilisation du système de désolvatation, le développement a été abandonné à cause de la destruction des complexes d'arsenic et de l'adsorption de ce dernier à la surface de la membrane [125]. Dans l'ensemble de leur étude, l'ESI-MS est utilisée en mode SIM (*single ion monitoring*) pour suivre les complexes dans un échantillon, cependant les conditions d'ionisation sont rarement décrites. La quantification est, dans tous les cas, réalisée par ICP-MS, avec un étalonnage externe à l'arsenic. À titre d'exemple, la Figure 27 présente une séparation obtenue avec ce système de couplage RP-HPLC ESI-MS/ICP-MS.



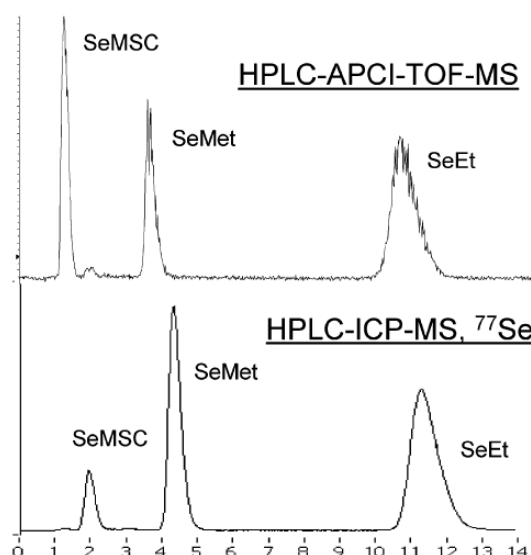
**Figure 27 : séparation de complexes d'arsenic par RP-HPLC couplée simultanément à l'ESI-MS et l'ICP-MS. Phase stationnaire : Spherisorb ODS2 (250×4.6 mm ; 5 µm). Phase mobile gradient eau/méthanol ; acide formique 1 %. PC : phytochelatine ; GS : glutathion. [128]**

D'après cette figure on peut remarquer que seuls quatre complexes sont suivis en ESI-MS (pic 5, 9, 10, 13) alors que 14 espèces sont détectées en ICP-MS. Le mode SIM de l'ESI-MS ne semble donc pas adapté puisque 10 espèces n'ont pas pu être caractérisées.

Une autre équipe décrit le développement d'un couplage de l'IP-HPLC avec l'APCI-MS (ionisation chimique à pression atmosphérique) et l'ICP-MS dans le cadre de la spéciation du sélénium [131]. L'objectif de cette étude a été l'identification de nouvelles espèces de sélénium à l'état de trace grâce au développement d'un programme

spécifique de traitement de données chromatographiques. La largeur, le temps de rétention et l'aire des pics chromatographiques ont été obtenus simultanément avec deux spectromètres de masse à haute résolution, un ICP-SF-MS à double secteur magnétique et un APCI-Qq-TOF-MS à filtre quadripolaire et temps de vol. La source d'ionisation APCI est une source comparable à celle de l'ESI. L'APCI permet d'acquérir des informations moléculaires et structurales pour des espèces difficilement ionisables et de polarité plus faible. En APCI, un aérosol est formé à l'aide d'un nébuliseur conventionnel et d'un gaz de nébulisation chauffé avant d'être ionisé en traversant un champ électrique créé par une électrode à décharge corona.

Dans cette étude, la séparation a été réalisée par IP-HPLC avec une phase stationnaire fonctionnalisée par des chaînes carbonées octadécyles et une phase mobile composée d'un mélange eau/méthanol 75/25 avec 10 mmol.L<sup>-1</sup> d'acide formique et 1 mmol.L<sup>-1</sup> d'acide perfluoroheptanoïque comme agent d'appariement d'ions. Un diviseur de flux a été obtenu en combinant un T sans volume mort et des longueurs de tubulures adéquates pour obtenir un rapport de flux 1 : 3 scindé dans les deux spectromètres de masse. Un désolvateur de type Apex a été utilisé afin d'affiner les pics chromatographiques. Afin d'éviter le dépôt de carbone au niveau des cônes, de l'oxygène a également été introduit dans le gaz de transport au niveau de l'Apex. La Figure 28 présente les chromatogrammes de la séparation de trois organosélénisés contenus dans un échantillon par IP-HPLC couplée simultanément à l'ICP-MS et l'APCI-MS.

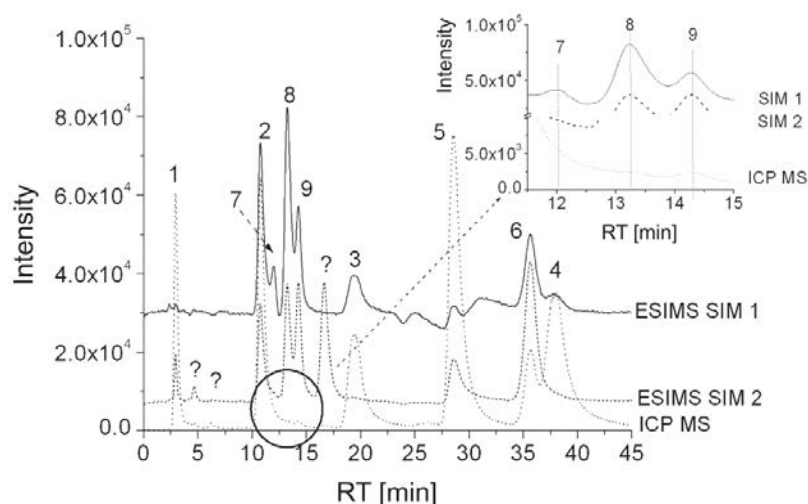


**Figure 28 : séparation d'un échantillon modèle contenant trois organosélénisés (SeMSC : Se-méthylsélénométhylcystéine ; SeMet : sélénométhionine ; SeEt : L-Sélénéthionine) par IP-HPLC couplée simultanément à l'APCI-MS et l'ICP-MS [131] (colonne Supelco Discovery HS C18 (20 x 2,1 mm ; 3  $\mu$ m) ; phase mobile : eau/méthanol 75/25 (v/v) ; [acide formique] = 10 mM ; [acide perfluoroheptanoïque] = 1mM ; pH 2,8)**

La Figure 28 montre que les pics chromatographiques présentent des largeurs de pics similaires permettant de corréler la détection avec chaque spectromètre de masse. Pour le temps de rétention, une correction est nécessaire pour permettre la comparaison avec chaque instrument, en raison des longueurs de tubulures différentes amenant la phase mobile vers l'APCI-MS et l'ICP-MS. La phase mobile est majoritairement composée d'eau avec notamment un agent d'appariement d'ions. Cette phase mobile aurait pu présenter des inconvénients si une source ESI avait été employée selon l'agent d'appariement d'ions utilisé.

Une méthode de séparation par HILIC couplée simultanément à l'ESI-MS et à l'ICP-MS a également été mise en œuvre pour l'analyse de spéciation de l'arsenic [110]. L'objectif de cette étude était de suivre et de quantifier des espèces d'arsenic dans le domaine de la toxicologie. A cette fin, une méthode de séparation, de caractérisation et de quantification des organoarséniés a été développée en couplant simultanément la chromatographie en mode HILIC aux spectrométries de masse ICP-MS et ESI-MS. De manière plus précise, le couplage simultané a permis le suivi d'espèces contenant de l'arsenic, la quantification par ajouts dosés de l'espèce d'arsenic majoritairement présente dans les milieux d'intérêt, par HILIC ICP-MS et l'identification structurale par HILIC ESI-MS des espèces suivies par ICP MS. La méthode a été mise au point avec un échantillon modèle et validée avec un matériau de référence certifié. La séparation des espèces d'intérêt a été réalisée avec une phase stationnaire à fonctions zwitterioniques

sulfobétaïne. Suite à une séparation en mode gradient, de 78/22 à 70/30 ACN/Acétate d'ammonium ( $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,3), le flux chromatographique est partagé, grâce à un diviseur de flux commercial, suivant le ratio 1 : 4 et dirigé simultanément vers un ESI-MS quadripolaire et un ICP-MS quadripolaire. L'introduction directe de solvant organique jusque dans le plasma de l'ICP-MS a engendré une instabilité de ce dernier et ce malgré l'utilisation d'une torche spéciale de faible diamètre interne et l'ajout d'oxygène à l'aérosol. Une diminution d'un facteur 10 de la sensibilité en ICP-MS a été observée dans ces conditions chromatographiques. La Figure 29 présente un chromatogramme de la séparation et la détection simultanée d'organoarséniés par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS.



**Figure 29 : séparation d'organoarséniés par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS en mode gradient. SIM 1 et SIM 2 correspondent aux deux modes de détection appliqués en ESI-MS [110] (colonne ZIC-HILIC ( $150 \times 2,1 \text{ mm}$  ;  $3,5 \mu\text{m}$ ) ; phase mobile : gradient de 78/22 à 70/30 ACN/Acétate d'ammonium ( $125 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,3))**

Comme le montre la Figure 29, les deux spectromètres de masse permettent le suivi d'espèces d'arsenic, par l'analyse de l'arsenic au sein des espèces en ICP-MS et par la mise en œuvre des modes SIM 1 (single ion monitoring) et SIM 2 en ESI-MS. Le mode SIM 1 permet de suivre les ions majoritaires de chaque organoarsénié et le mode SIM 2 les ions  $\text{As}^+$  et  $\text{AsO}^+$ . Une méthode de quantification par ICP-MS a également été mise au point par ajouts dosés et a permis de quantifier des espèces d'arsenic à des concentrations supérieures à  $10 \mu\text{g/L}$ . Cette méthode de quantification a été validée en analysant l'arsénobétaïne dans un matériau de référence certifié de muscle de poisson.

La même équipe a également utilisé ce couplage simultané de l'HILIC avec l'ICP-MS et l'ESI-MS dans une étude plus fondamentale où les mécanismes de rétention d'espèces d'arsenic ont été analysés [109]. Cette étude a permis de mieux appréhender la

rétenition des organoarséniés et l'impact des paramètres chromatographiques comme le pH et la concentration en sels sur leur détection par HILIC. La plus-value de l'utilisation du couplage simultané de l'ESI-MS et de l'ICP-MS n'a pas été abordée et aucune indication sur l'apport de ce couplage pour l'obtention des résultats n'est décrite.

*Le développement du couplage simultané entre une technique chromatographique et les spectrométries de masse élémentaire ICP-MS et moléculaire, ESI-MS et APCI-MS, n'a que rarement été réalisé pour l'analyse de spéciation d'organo-éléments. Ce type de couplage permet d'obtenir en une seule analyse des données structurales, élémentaires et isotopiques. La majeure partie du flux chromatographique est dirigée vers l'ESI-MS, technique de détection la moins sensible. Quel que soit le mode de séparation chromatographique utilisé (HILIC ou IP-HPLC), des précautions au niveau du système d'introduction de l'ICP-MS telles que l'ajout d'oxygène dans le gaz plasmagène ou l'utilisation d'un système de désolvatation doivent être prises afin d'obtenir un plasma stable et une sensibilité optimale. Les méthodes de quantification sont développées par HILIC ICP-MS et permettent de quantifier des espèces à des concentrations de l'ordre de 10 µg/L. À notre connaissance, aucune étude n'a décrit le développement du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC à l'ESI-MS et à l'ICP-MS pour l'analyse de spéciation des lanthanides.*

## **4 Conclusion**

Cette étude bibliographique a permis de mettre en évidence que les modes de séparation RP-HPLC et IP-HPLC ont été utilisés pour le suivi, la séparation et la quantification de complexes de gadolinium pour l'étude de la stabilité d'agents de contraste à base de gadolinium. Ces modes chromatographiques sont cependant plus adaptés à la séparation de composés hydrophobes pour la RP-HPLC et les phases mobiles employées en IP-HPLC sont peu compatibles avec les paramètres de détection en ESI-MS selon l'agent d'appariement d'ions utilisé. Plus récemment, la séparation des complexes de lanthanides a été développée par chromatographie en mode HILIC pour l'analyse de spéciation du gadolinium dans des matrices environnementales et biologiques mais également pour l'analyse de spéciation des métaux lourds et de transition et des organo-éléments comme l'arsenic le sélénium et l'étain. Les caractéristiques de l'HILIC permettent d'envisager la séparation de composés polaires et

hydrophiles. La phase stationnaire à fonctions zwitterioniques a été majoritairement utilisée dans ces études ainsi que la phase stationnaire à groupements amide dans un deuxième temps. Les phases mobiles sont composées d'une majeure partie d'acétonitrile, supérieure à 60 %, contenant des sels volatils comme le formate d'ammonium et l'acétate d'ammonium. Ces phases mobiles semblent plus adaptées aux conditions de détection par ESI-MS.

Concernant le suivi et la quantification d'espèces d'intérêt, le couplage HILIC ICP-MS est principalement reporté en raison de la plus grande sensibilité de cet instrument. Pour l'identification et la caractérisation structurale de nouvelles espèces et d'espèces inconnues, le couplage HILIC ESI-MS a été mis en œuvre. Dans certaines études, le couplage HILIC ICP-MS a été utilisé de manière complémentaire à l'ESI-MS afin de confirmer la présence d'un élément au sein des espèces caractérisées par ESI-MS. De même, le couplage HILIC ESI-MS a été mis en œuvre, dans d'autres études, en complément de l'HILIC ICP-MS pour la mise au point de la séparation et l'identification des complexes quantifiés par ICP-MS.

Concernant la mise en place d'un couplage simultané d'une technique chromatographique avec l'ICP-MS et l'ESI-MS pour l'analyse de spéciation, celle-ci est essentiellement décrite pour la séparation d'espèces d'arsenic et de sélénium par RP-HPLC, IP-HPLC et HILIC. Quel que soit le mode chromatographique utilisé pour la séparation, la majeure partie de la phase mobile est dirigée vers l'ESI-MS en raison de la plus grande sensibilité de l'ICP-MS. Des précautions au niveau de l'ionisation par ICP-MS ont été prises comme l'ajout d'oxygène dans le gaz plasmagène ou l'utilisation d'un système de désolvatation afin que l'introduction de molécules organiques ne détériore pas la stabilité et la sensibilité de la mesure en ICP-MS.

Aucune étude ne présente la séparation par HILIC de différents complexes de plusieurs lanthanides et le développement d'un couplage simultané d'une technique chromatographique avec l'ICP-MS et l'ESI-MS pour l'analyse de spéciation des lanthanides.

Ainsi les prochains chapitres seront consacrés à la mise au point de ce couplage simultané pour la séparation, la caractérisation et la quantification de complexes de lanthanides d'intérêt pour le domaine du nucléaire. Le développement d'une méthode de séparation des complexes de plusieurs lanthanides par HILIC ESI-MS est présenté dans un premier temps.

**Chapitre III**  
**Séparation et caractérisation des complexes**  
**de Ln en mode HILIC couplé à la**  
**spectrométrie de masse à source**  
**d'ionisation électrospray**



Dans ce chapitre, la mise au point d'une méthode de séparation et de caractérisation de complexes de lanthanides par chromatographie en mode HILIC couplée à la spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray est présentée. Cinq phases stationnaires fonctionnalisées par différents groupements polaires ont d'abord été évaluées afin de définir les meilleures conditions de rétention et de sélectivité. Une étude portant sur les mécanismes de rétention des complexes de lanthanides avec la phase stationnaire sélectionnée a été menée. À cette fin, un criblage d'une large gamme de composition de phases mobiles a été effectué. Dans le but de réduire le temps d'analyse, paramètre d'intérêt pour l'analyse d'échantillons radioactifs, des conditions d'analyse rapide de type « fast HPLC » ont ensuite été appliquées avec une colonne de granulométrie sub-2 µm et de longueur inférieure. Enfin la caractérisation structurale des complexes de lanthanides par ESI-MS a été effectuée.

## 1 Système d'étude

Le système d'étude est composé de complexes de lanthanides représentatifs des espèces rencontrées dans les phases aqueuses de désextraction des procédés de traitement du combustible usé. Les lanthanides d'intérêt sélectionnés sont, du plus léger au plus lourd, le néodyme, l'euprimum, le gadolinium et l'erbium (Figure 30).

57 138.91	58 140.12	59 140.91	60 144.24	61 (145)	62 150.36	63 151.96	64 157.25	65 158.93	66 162.50	67 164.93	68 167.26	69 168.93	70 173.05	71 174.97
La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
LANTHANE	CÉRIUM	PRASÉODYME	NÉODYME	PROMÉTHIUM	SAMARIUM	EUROPIUM	GADOLINIUM	TERBIUM	DYSPROSIUM	HOLMIUM	ERBIUM	THULIUM	YTTÉRIUM	LUTÉTIUM

Figure 30 : série des lanthanides. En rouge les lanthanides sélectionnés.

Ces lanthanides sont mis en présence de DTPA (acide diéthylènepentaacétique) et d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) dont les structures sont présentées en Figure 31 :

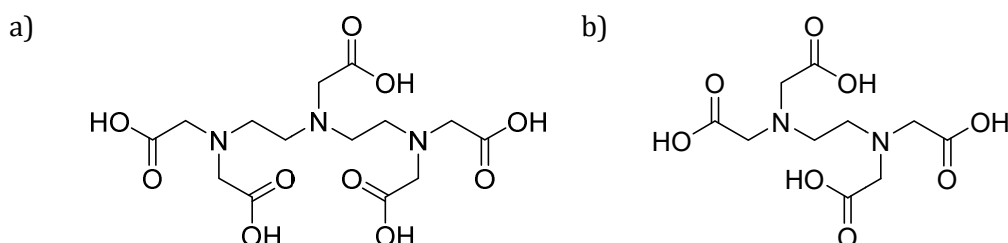


Figure 31 : structure a) du DTPA b) de l'EDTA

Les échantillons, dont la préparation est décrite dans la partie expérimentale (annexe 4), sont tous ajustés à un pH de 3,2, représentatif de celui rencontré dans les phases d'intérêt des procédés de traitement du combustible nucléaire usé.

Les diagrammes de spéciation théorique du DTPA et de l'EDTA ont été établis afin de connaître les espèces susceptibles d'être présentes en solution (Figure 32).

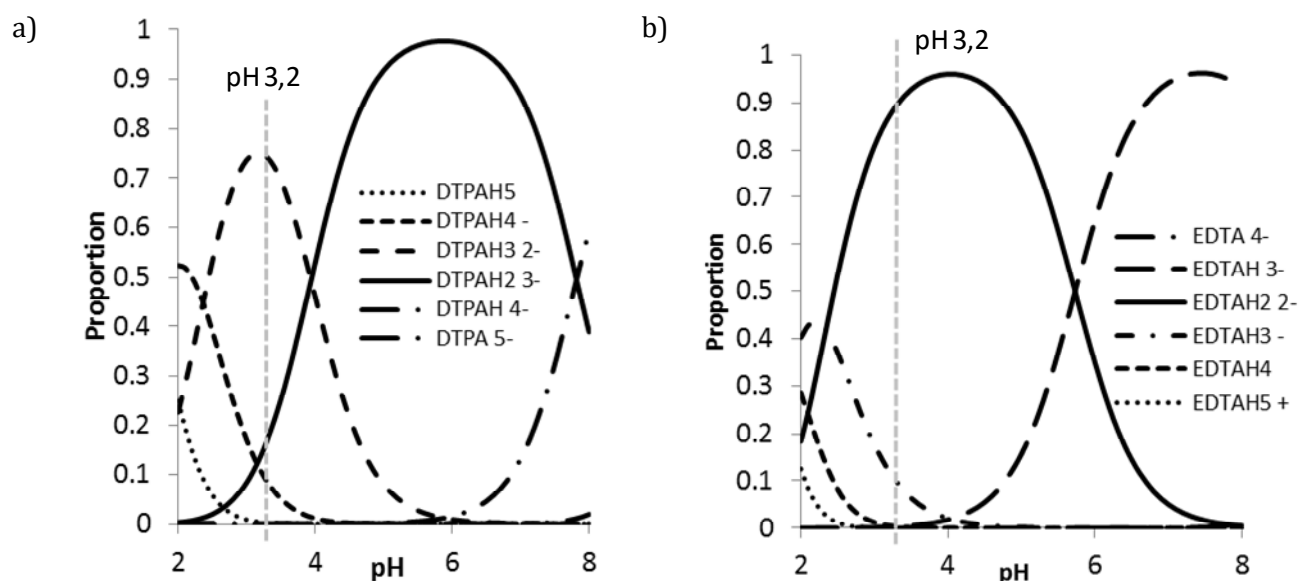
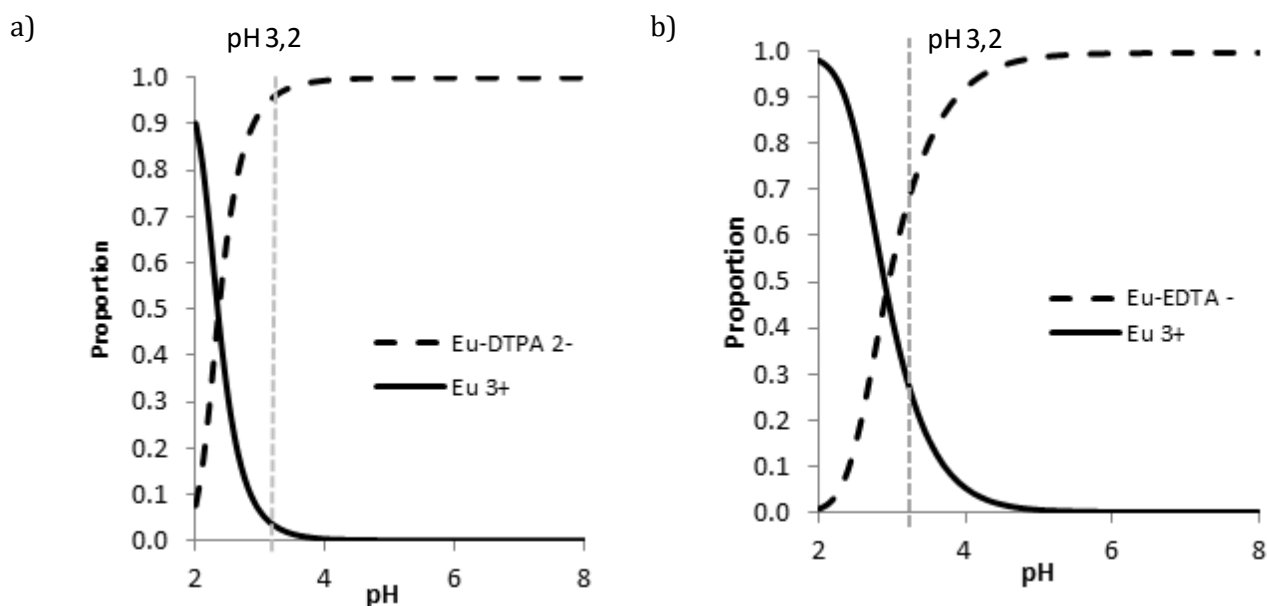


Figure 32 : diagramme de spéciation théorique des espèces a) du DTPA b) de l'EDTA en fonction du pH pour  $[DTPA]_T = [EDTA]_T = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \text{ L}$ .

Ces diagrammes ont été tracés à l'aide du logiciel PhreeqC et des constantes de stabilité issues de la database 46 (Critical Selected Stability Constants of Metal Complexes, [15]) du NIST (National Institute of Standards and Technology). Les formes prédominantes à pH 3,2 sont les formes di-chargées DTPAH<sub>3</sub><sup>2-</sup> et EDTAH<sub>2</sub><sup>2-</sup> (les formes neutres sont notées DTPAH<sub>5</sub> et EDTAH<sub>4</sub>).

Les diagrammes de spéciation d'un lanthanide en présence de DTPA ou d'EDTA en fonction du pH ont également été modélisés afin de connaître la proportion de complexes de lanthanides dans nos conditions d'analyse. À titre d'exemple, les diagrammes de spéciation de l'euprécium en présence soit de DTPA soit d'EDTA dans des conditions stœchiométriques sont présentés en Figure 33.



**Figure 33 : diagramme de spéciation de l'euprémium en présence a) du DTPA et b) de l'EDTA en condition stœchiométrique  $[Eu] = [DTPA]_T = [EDTA]_T = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ .**

À pH 3,2 en conditions stœchiométriques, plus de 95 % de l'euprémium est complexé en présence de DTPA contre 70 % en présence d'EDTA. Cette différence de proportion est due à la valeur plus élevée de la constante de complexation de l'euprémium avec le DTPA ( $\log(K_{Eu-DTPA}) = 22,29$ ) que celle observée avec l'EDTA ( $\log(K_{Eu-EDTA}) = 17,25$ ). Les complexes de lanthanides avec l'EDTA et le DTPA sont de stœchiométrie 1 : 1 et respectivement mono et dichargés,  $[Ln-EDTA]^-$  et  $[Ln-DTPA]^{2-}$ . Ils seront notés Ln-EDTA et Ln-DTPA par la suite.

Afin d'augmenter la proportion de lanthanides complexés, le pH de la solution pourrait être augmenté. Dans notre cas, cette solution n'est pas envisageable, le pH étant imposé par celui des solutions des procédés de traitement. Une autre possibilité est d'augmenter le nombre d'équivalents de ligand par rapport à celui des lanthanides. Ce cas de figure est représentatif des phases aqueuses de dés extraction des procédés de traitement, dans lesquelles les agents dés extractants sont en excès par rapport aux éléments à dés extraire. Dans notre étude, un excès de ligand a donc été introduit et la proportion lanthanide total:ligands totaux est de 1:1,25. À titre d'exemple, le diagramme de spéciation de l'euprémium en présence d'EDTA en excès (1:1,25) est présenté en Figure 34.

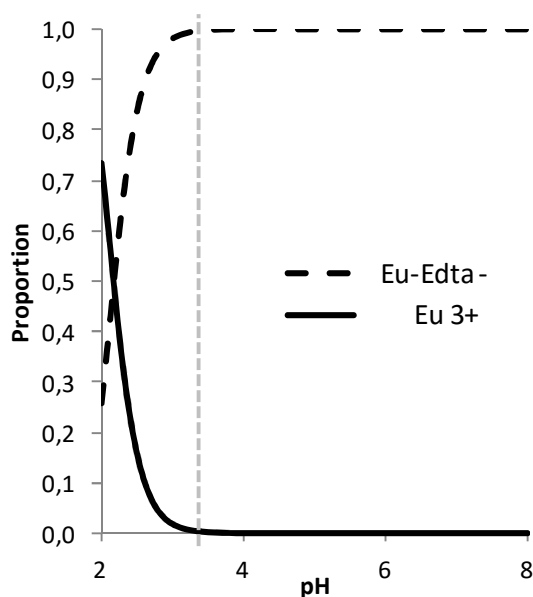


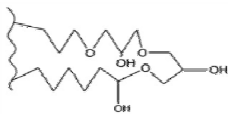

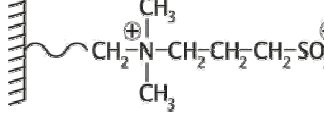
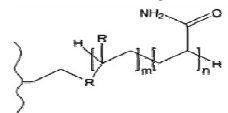
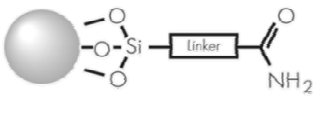
Figure 34 : diagramme de spéciation de l'euprémium en présence d'EDTA en excès ;  $[\text{Eu}] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ;  $[\text{EDTA}]_{\text{T}} = 1,25.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

Dans ces conditions, la complexation de l'euprémium par l'EDTA est quasi-totale, soit plus de 99 % de forme complexée.

## **2 Sélection de phases stationnaires pour la séparation de complexes de lanthanides en mode HILIC**

### ***2-a) Évaluation de la sélectivité de différentes phases stationnaires polaires***

À notre connaissance, la séparation de complexes contenant différents lanthanides en mode HILIC n'a jamais été décrite dans la littérature. Par ailleurs, l'étude bibliographique a montré que les phases stationnaires fonctionnalisées par des groupements zwitterioniques restent très majoritairement utilisées pour l'analyse de la spéciation du gadolinium. Dans ce contexte, la sélection *a priori* d'une phase stationnaire pour la séparation des complexes de lanthanides à ligands polyaminocarboxyliques n'est pas triviale, les propriétés physico-chimiques très proches des lanthanides rendant cette sélection d'autant plus délicate. Par conséquent, des colonnes de dimensions similaires contenant des phases stationnaires de dimensions similaires et fonctionnalisées par différents groupements polaires ont été sélectionnées pour cette étude. Le Tableau 11 présente les principales caractéristiques de ces phases stationnaires.

Phases	Groupe fonctionnel et dimensions	Taille de pores (Å)	Surface spécifique (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Type d'interactions
Luna HILIC	Diol réticulé  150 x 3 mm ; 5 µm	200	200	Liaison hydrogène
Inertsil® cyano CN-3	Cyanopropyle  150 x 3 mm ; 3 µm	100	450	Dipôle-dipôle
ZIC®-HILIC	Sulfobétaine zwitterionique  150 x 2 mm ; 5 µm	200	135	Électrostatique faible
TSK gel Amide-80	Carbamoyle  150 x 2 mm ; 3 µm	80	450	Liaison hydrogène
XBridge™ Amide	Carbamoyle  150 x 2,1 mm ; 3,5µm	130	185	Liaison hydrogène

**Tableau 11 : caractéristiques des phases stationnaires sélectionnées pour l'évaluation de la séparation des complexes de lanthanides**

Les phases stationnaires à fonctions diol, cyanopropyle et amide sont neutres. La colonne à groupements zwitterioniques porte en permanence une charge positive et une charge négative, mais est de charge globale toujours neutre. Les phases stationnaires greffées par des groupements amine n'ont pas été sélectionnées dans cette étude. En effet, des travaux précédemment menés au laboratoire ont montré que les complexes de DTPA sont trop retenus avec ce type de phase stationnaire, même avec des phases mobiles très riches en eau. Ce comportement est dû aux interactions électrostatiques fortes entre les analytes de charge négative et les fonctions ammonium de la phase stationnaire, résultant de la protonation des fonctions amine. La forte rétention des composés chargés négativement avec les phases stationnaires à fonctions amine a également été observée dans la littérature [93].

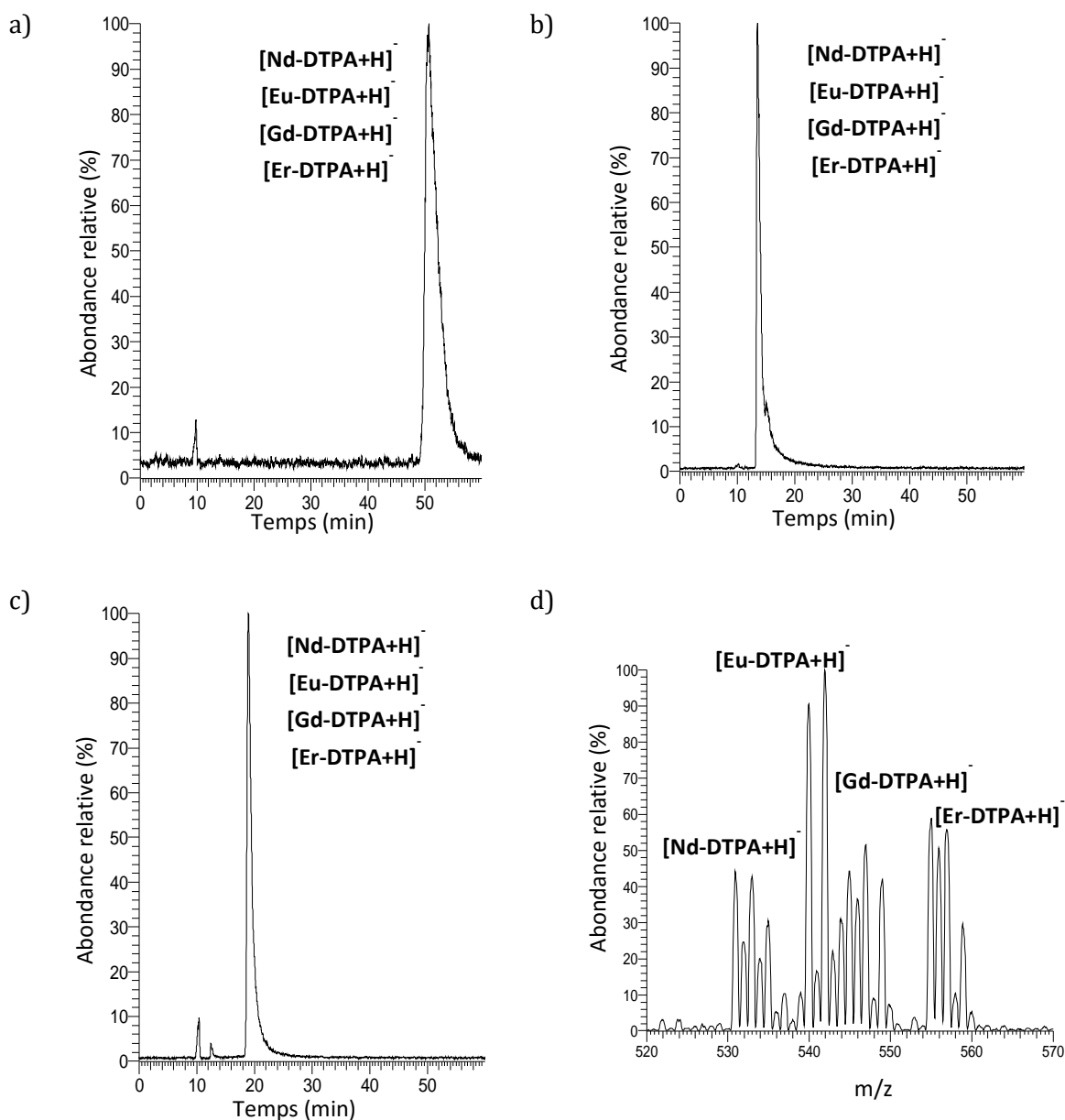
Pour mener à bien cette étude comparative, le système composé de complexes Ln-DTPA (Nd, Eu, Gd, Er) a été considéré. Des expériences préliminaires ont été réalisées avec des phases mobiles, classiques pour le mode HILIC, c'est-à-dire contenant une proportion 80/20 (v/v) acétonitrile/eau et différentes concentrations d'acétate d'ammonium (5 et 20 mmol.L<sup>-1</sup>) (annexe 4). Avec l'ensemble des phases stationnaires criblées, des temps de rétention de plusieurs heures ont été obtenus, ce qui nous a conduits à diminuer la teneur d'acétonitrile dans la phase mobile. Des compositions de phases mobiles permettant d'obtenir des temps de rétention inférieurs à une heure ont donc été utilisées (70/30 (v/v) acétonitrile/eau, contenant 5 ou 20 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium) (annexe 4). Comme précisé dans l'étude bibliographique, les phases mobiles utilisées pour l'élution des agents de contraste à base de gadolinium sont composés d'un pourcentage d'acétonitrile inférieur à 80 %. Nos résultats sont donc également en accord avec la littérature.

Les paramètres de l'ESI-MS ont été optimisés pour que les conditions d'ionisation génèrent le moins de fragments et d'adduits possible ainsi qu'un signal intense et stable. Le signal des ions Ln-DTPA a été suivi. L'étude structurale des complexes par ESI-MS a été réalisée et est présentée en fin de chapitre. Les conditions d'ionisation en ESI-MS sont présentées dans le tableau suivant :

Paramètres ESI-MS	Valeurs
Mode d'acquisition	fullscan
Tension de spray	- 4 kV
Gaz séchant	60 ua
Gaz auxiliaire	15 ua
Température de vaporisation	100°C
Température du capillaire de transfert	270°C

**Tableau 12 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS**

Dans les conditions de phases mobiles précitées, les phases stationnaires fonctionnalisées par les groupements diol, zwitterionique et cyano ont conduit à la co-élution des complexes Ln-DTPA. La Figure 35 présente les chromatogrammes et un spectre de masse associé à ces trois phases stationnaires à titre d'illustration.



**Figure 35 : chromatogrammes des complexes Ln-DTPA dans les proportions Ln:DTPA 1:1,25 avec [Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] =  $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> et avec une phase stationnaire à fonctions a) zwitterioniques b) cyano c) diol. Phase mobile : 70/30 (v/v) acétonitrile/eau [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 5 mmol.L<sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,1 mL.min<sup>-1</sup>. V<sub>inj</sub> = 5 µL. d) spectre de masse extrait du pic chromatographique de la Figure 35a.**

Bien que fonctionnalisées par des groupements différents, les phases stationnaires à fonctions diol, cyano et zwitterioniques ne sont pas suffisamment sélectives pour donner lieu à la séparation de complexes de lanthanides contenant le même ligand.

La phase stationnaire fonctionnalisée par des groupements diol réticulé est composée d'un réseau polymérique de chaînes carbonées avec, à leur extrémité, des groupements hydroxyle reliés par des fonctions éther (Tableau 11). Les groupements hydroxyle permettent des liaisons hydrogène avec les analytes tandis que le squelette

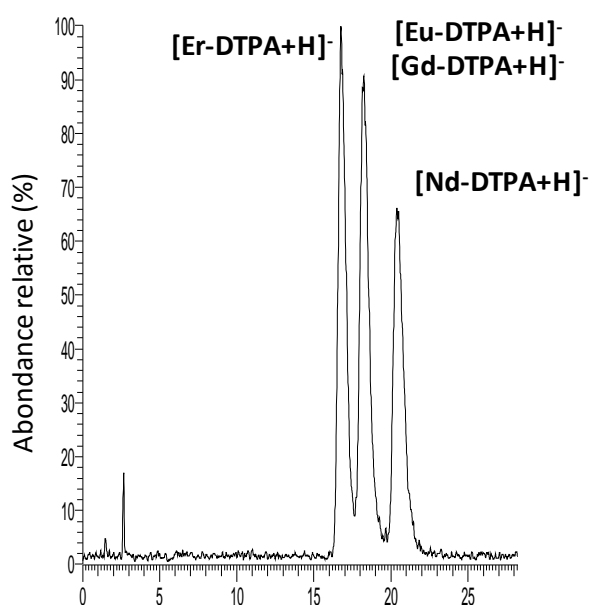
carboné confère des propriétés hydrophobes à cette catégorie de phases stationnaires. La phase stationnaire à fonctions cyanopropyle est constituée de groupements nitrile reliés à une surface de silice par une chaîne propylène. La fonction nitrile, une triple liaison et un doublet non-liant, privilégie des interactions dipôle-dipôle entre les analytes et la phase stationnaire tandis que sa capacité d'interaction via des liaisons hydrogène est extrêmement limitée, rendant cette phase stationnaire moins hydrophile. L'analyse bibliographique a montré qu'aucune étude avec la phase stationnaire à fonctions diol réticulé n'est décrite pour la séparation d'espèces de lanthanides et que la phase stationnaire à groupements cyano n'a jamais été utilisée pour l'analyse de spéciation. Seules deux études reportent l'utilisation de colonnes à fonctions diol dans le cadre de l'analyse de spéciation de métaux et d'arsenic par HILIC ESI-MS [93,111]. Nos résultats montrent que ces deux phases stationnaires ne sont pas assez polaires pour séparer les complexes Ln-DTPA.

Bien que la phase stationnaire à groupements zwitterioniques ne soit pas suffisamment sélective pour séparer les complexes de type Ln-DTPA, celle-ci génère une plus forte rétention que les phases stationnaires à fonctions cyanopropyle et diol, ce qui confirme l'utilisation très limitée de ces deux dernières pour de telles études. Les temps de rétention sont de l'ordre de 50 minutes pour la phase stationnaire à fonctions zwitterioniques contre une vingtaine de minutes pour les autres phases (Figure 35). La phase stationnaire utilisée dans notre étude est fonctionnalisée par des groupements sulfobétaïne, composés d'une fonction amine quaternaire chargée positivement et séparée, par une courte chaîne alkyle, d'un groupement sulfonate chargé négativement. La charge de la phase stationnaire est globalement neutre quel que soit le pH. Ce type de phase stationnaire est connu pour adsorber fortement l'eau à sa surface, faisant du mécanisme de partition le mécanisme primaire [27]. Des interactions électrostatiques faibles peuvent avoir lieu entre les groupements amine quaternaire ou sulfonate et les composés chargés, tout comme des liaisons hydrogènes peuvent avoir lieu entre ces mêmes groupements et les analytes [132]. Dans notre étude, les complexes sont chargés et les ligands ont des fonctions carboxyliques, par lesquelles ils peuvent interagir avec la phase stationnaire via des liaisons hydrogène et électrostatiques. Cependant, la combinaison de ces types d'interactions n'a pas induit une sélectivité suffisante pour permettre la séparation des complexes Ln-DTPA, bien que ceux-ci soient chargés. Comme indiqué dans l'étude bibliographique, la séparation d'agents de contraste à base



de gadolinium a été essentiellement réalisée avec ce type de phases stationnaires [115-119]. Au sein des agents de contraste, le gadolinium est complexé par différents acides polyaminocarboxyliques alors que notre étude concerne plusieurs complexes contenant le même ligand mais des lanthanides différents, donnant lieu à des propriétés physico-chimiques différentes, qui vont par conséquent influencer la rétention et la sélectivité. La co-élution des complexes Ln-DTPA que nous avons observée avec cette phase stationnaire est en accord avec la littérature. En effet, avec une phase stationnaire à fonctions zwitterioniques, les complexes Gd-DTPA et Eu-DTPA n'ont pas été séparés [117], tout comme des métaux de transition complexés par le même ligand [95]. Une explication possible à la co-élution des complexes de lanthanides dans notre cas, est qu'il existe des interactions spécifiques entre la phase stationnaire et les complexes de lanthanides par l'intermédiaire de leur ligand, qui est le même dans tous les complexes.

En revanche, les deux phases stationnaires à fonctions amide (TSK gel 80 et XBridge) se sont révélées appropriées pour la séparation de complexes Ln-DTPA dans les mêmes conditions de phases mobiles (annexe 4) comme le montre la Figure 36, à titre d'exemple.



**Figure 36 : chromatogramme des complexes Ln-DTPA dans les proportions Ln:DTPA 1:1,25 avec  $[Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  et avec la colonne TSK gel amide. Phase mobile : 70/30 (v/v) acétonitrile/eau  $[NH_4CH_3COO] = 5 \text{ mmol.L}^{-1}$  0,5 % d'acide formique. Débit =  $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ .  $V_{inj} = 5 \mu\text{L}$**

Une co-élution partielle des complexes Eu-DTPA et Gd-DTPA a été observée (Figure 36). L'ESI-MS a toutefois permis une identification de chaque espèce et l'attribution de leur temps de rétention. Le spectre de masse de chaque complexe a été extrait du pic

chromatographique et comparé avec les motifs isotopiques théoriques. Les phases stationnaires à fonctions amide sont composées de groupements carbamoyle susceptibles d'interagir avec les analytes par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. Ces phases stationnaires sont très fréquemment utilisées pour l'étude de composés organiques polaires en HILIC [37] et leur forte hydrophilie conduit à une rétention plus importante de nombreux composés polaires par rapport à d'autres phases stationnaires, tel que la silice vierge [133]. Concernant la séparation d'espèces de lanthanides, l'utilisation de la phase stationnaire à fonctions amide n'a jamais été décrite mais est largement répandue pour l'analyse de spéciation du sélénium [103-108]. Les phases stationnaires TSK gel 80 et XBridge ayant des propriétés de surface différentes, des caractéristiques de rétention différentes sont attendues. Le support de greffage de la TSK gel 80 est constitué de silice vierge et celui de la XBridge de silice hybride, à savoir que les groupements SiO sont pontés avec des groupements éthyle, diminuant le nombre de silanols résiduels [134]. Les caractéristiques de ces deux phases stationnaires seront étudiées dans le paragraphe suivant.

*La co-élution des complexes Ln-DTPA est observée avec la phase stationnaire à fonctions zwitterioniques sulfobétaïne, malgré son utilisation fréquente pour la séparation des agents de contraste à base de gadolinium. La co-élution des Ln-DTPA est également observée avec les phases stationnaires fonctionnalisées par des groupements cyano et diol. Seules les phases stationnaires fonctionnalisées par des groupements amide présentent une sélectivité suffisante pour envisager une séparation de complexes de lanthanides.*

## **2-b) Sélection de la phase stationnaire à fonctions amide la plus performante**

Afin de sélectionner la colonne à fonctions amide conduisant à la meilleure séparation de complexes de lanthanides à ligands polyaminocarboxyliques, les facteurs de rétention ( $k$ ), les facteurs de sélectivité ( $\alpha$ ), la résolution ( $R_s$ ) et le nombre de plateaux ( $N$ ) ont été déterminés.

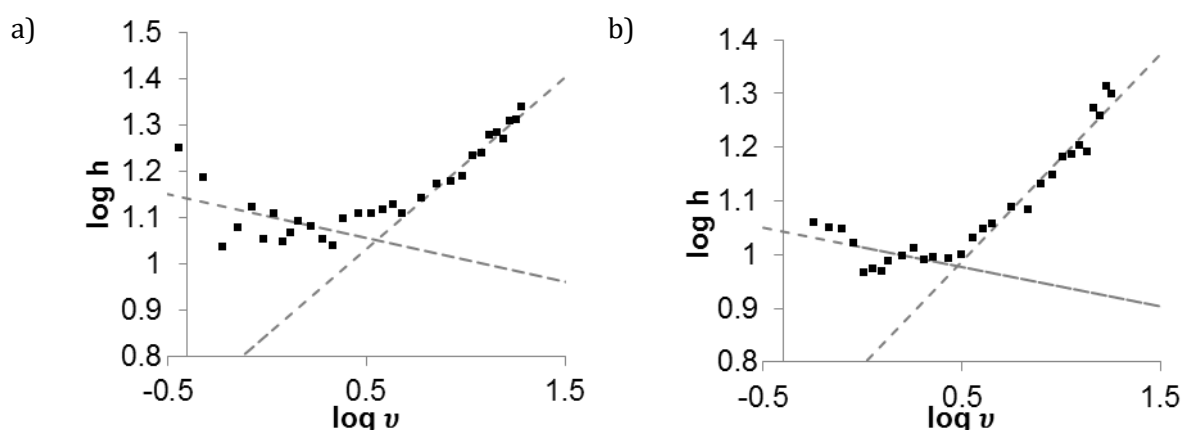
La première étape a été d'évaluer le débit optimal expérimental de chaque colonne avec le complexe Gd-DTPA. Les courbes de Knox ont été obtenues avec une phase mobile contenant 68/32 (v/v) acétonitrile/eau et 5 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium. Cette composition de phase a été sélectionnée de manière à obtenir des facteurs de rétention compris entre 5 et 10 avec les débits optimaux théoriques calculés (annexe 3).

L'équation de Knox (Équation 3) permet de relier la hauteur de plateau théorique réduite ( $h$ ), représentative de l'efficacité de la colonne, et la vitesse linéaire réduite ( $v$ ), représentative du débit de la colonne [135].

$$h = Av^{\frac{1}{3}} + \frac{B}{v} + Cv$$

**Équation 3 : équation de Knox avec A, B, C des constantes prenant en compte les phénomènes de dispersion intra-colonne.**

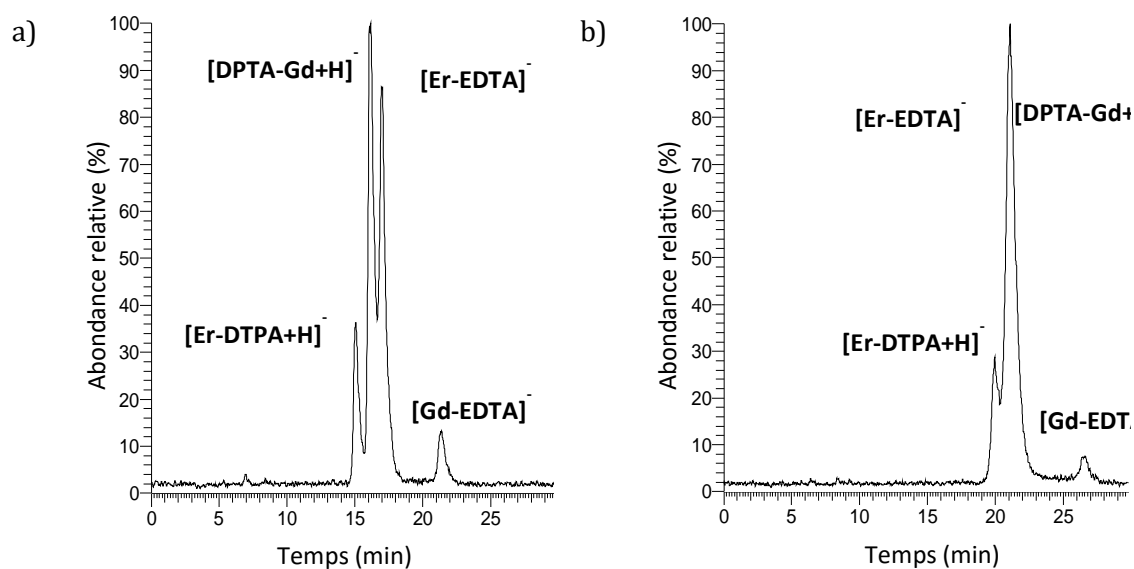
La Figure 37 présente les courbes de Knox en coordonnées logarithmiques obtenues pour chaque colonne lors de l'élution du complexe Gd-DTPA:



**Figure 37 : courbe de Knox de a) la colonne XBridge (150 x 2,1 mm ; 3,5 $\mu$ m) et b) la colonne TSK gel 80 (. Phase mobile : 68/32 (v/v) acétonitrile/eau [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 5 mmol.L<sup>-1</sup>; 0,5 % d'acide formique. V<sub>inj</sub> = 5  $\mu$ L**

Les débits expérimentaux optimaux extraits des courbes de Knox sont 0,16 mL.min<sup>-1</sup> ( $h_{\min} = 1,05$ ) et 0,14 mL.min<sup>-1</sup> ( $h_{\min} = 0,97$ ) pour la XBridge et pour la TSK gel 80 respectivement. Pour la suite des expériences, le débit a été fixé à 0,15 mL.min<sup>-1</sup> pour les deux colonnes.

La deuxième étape a consisté à déterminer les données chromatographiques ( $k$ ,  $\alpha$ ,  $R_s$ ,  $N$ ) (annexe 3), avec le débit expérimental optimal, en mode isocratique, à différentes concentrations en acétate d'ammonium (5, 10 et 20 mmol.L<sup>-1</sup>), avec trois systèmes d'étude. L'un est composé de complexes Ln-DTPA (Nd, Eu, Gd, Er), l'autre de complexes Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) et le dernier de complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Gd, Er) dont la séparation est délicate dans ces conditions de phases mobiles (annexe 4). Les séparations obtenues pour cette paire critique sont illustrées en Figure 38 et l'ensemble des données chromatographiques sont rassemblées dans le Tableau 13.



**Figure 38 : séparation des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Gd, Er) avec a) la colonne XBridge et b) la colonne TSK gel. Phase mobile : 68/32 (v/v) acétonitrile/eau, 0,5 % d'acide formique ;  $[\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}] = 20 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Débit =  $0,15 \text{ mL.min}^{-1}$ .  $V_{\text{inj}} = 5 \mu\text{L}$ .  $[\text{Nd}] = [\text{Gd}] = [\text{Er}] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$**

		[NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO] = 5 mmol.L <sup>-1</sup>							
		k		α		Rs		N	
Système d'étude	Espèces	TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge
Ln (Nd, Eu, Gd, Er) +DTPA	Er-DTPA	7,1	5,3	1,1	1,1	1,0	0,9	1051	1287
	Gd-DTPA	7,8	5,8	1,0	1,0	0,2	0,3	1720	906
	Eu-DTPA	7,9	5,9					NC	600
	Nd-DTPA	9,1	6,8	1,2	1,1	1,1	1,3	NC	995
Ln (Nd, Eu, Gd, Er) + EDTA	Er-EDTA	8,8	6,3	1,3	1,3	2,8	2,8	3339	2983
	Gd-EDTA	11,8	8,3	ND	1,1	ND	1,1	NC	NC
	Eu-EDTA	ND	9,2					ND	NC
	Nd-EDTA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ln (Gd,Er) +DTPA/EDTA	Er-DTPA	7,2	5,3	1,1	1,1	0,9	0,8	NC	381
	Gd-DTPA	7,8	5,8	1,0	1,1	0,7	1,0	1143	2256
	Er-EDTA	8,1	6,3					3797	1758
	Gd-EDTA	10,6	8,2	1,3	1,3	ND	2,6	ND	NC

		[NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO] = 10 mmol.L <sup>-1</sup>							
		k		α		Rs		N	
Système d'étude	Espèces	TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge
Ln (Nd, Eu, Gd, Er) +DTPA	Er-DTPA	8,7	5,8	1,1	1,1	1,1	1,2	1942	2044
	Gd-DTPA	9,4	6,3	1,0	1,0	0,2	0,3	2882	2041
	Eu-DTPA	9,6	6,5					840	1320
	Nd-DTPA	10,7	7,2	1,1	1,1	1,3	1,3	2174	2047
Ln (Nd, Eu, Gd, Er) + EDTA	Er-EDTA	8,7	7,0	1,3	1,3	ND	3,7	4312	3032
	Gd-EDTA	11,4	9,1	1,1	1,1	1,2	1,4	NC	2266
	Eu-EDTA	12,8	10,1					1523	2218
	Nd-EDTA	ND	13,4	ND	1,3	ND	3,8	ND	NC
Ln (Gd,Er) +DTPA/EDTA	Er-DTPA	8,7	6,1	1,1 *	1,1	0,7 *	1,0	1182	840
	Gd-DTPA	9,4 *	6,6	1,0 *	1,1	0,2 *	0,7	1536	1803
	Er-EDTA	9,2 *	7,0					3407	3027
	Gd-EDTA	12,1	9,2	1,3	1,3	3,1	2,9	NC	NC

		[NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO] = 20 mmol.L <sup>-1</sup>							
Système d'étude	Espèces	k		α		Rs		N	
		TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge	TSK gel	XBridge
Ln (Nd, Eu, Gd, Er) +DTPA	Er-DTPA	8,4	5,8	1,1	1,1	1,1	1,1	3399	2461
	Gd-DTPA	9,0	6,3	1,0	1,0	0,2	0,3	3739	2313
	Eu-DTPA	9,2	6,5					2278	2896
	Nd-DTPA	10,1	7,2	1,1	1,1	1,2	1,3	2253	2177
Ln (Nd, Eu, Gd, Er) + EDTA	Er-EDTA	8,6	6,8	1,3	1,3	3,4	3,8	NC	2770
	Gd-EDTA	11,0	8,7	1,1	1,1	1,4	1,5	992	3220
	Eu-EDTA	12,2	9,6					3445	3145
	Nd-EDTA	16,2	12,5	1,3	1,3	4,2	4,3	1500	3206
Ln (Gd,Er) +DTPA/EDTA	Er-DTPA	8,5	5,9	1,1 *	1,1	0,7 *	1,2	1927	2365
	Gd-DTPA	9,0 *	6,4	1,0 *	1,1	0,2 *	0,9	2292	3031
	Er-EDTA	8,9 *	6,8					3717	3776
	Gd-EDTA	11,5	8,8	1,3	1,3	2,8	3,4	NC	2358

**Tableau 13 : données chromatographiques obtenues pour la séparation de complexes Ln-DTPA (Nd, Eu, Gd Er), de complexes Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd Er) et de complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Gd, Er). Phase mobile : 68/32 (v/v) acétonitrile/eau ; 0,5 % d'acide formique avec différentes concentrations en sels (5, 10 et 20 mol.L<sup>-1</sup>). Débit = 0,15 mL.min<sup>-1</sup>. V<sub>inj</sub> = 5 µL. Les espèces sont classées par ordre d'élution croissant. \* : changement dans l'ordre d'élution. Valeurs de α et Rs sont données dans l'ordre croissant. ND = non déterminé ; NC = non calculable. Les formules appliquées pour le calcul de k, α, Rs et N sont présentées en annexe 3. Les temps de rétention ont été obtenus par extraction des gammes de masse des pics chromatographiques de chaque complexe.**

Les données indiquent que :

- Les complexes de lanthanides sont dans tous les cas plus retenus avec la colonne TSK gel qu'avec la colonne XBridge. Cette rétention plus élevée peut être expliquée par la plus grande surface spécifique de la colonne TSK gel ( $450 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) comparée à celle de la colonne XBridge ( $185 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) (Tableau 11) qui induit ainsi une plus grande surface d'interaction disponible pour les analytes.

- Les colonnes ont des sélectivités similaires vis-à-vis des complexes de lanthanides, quelle que soit la concentration en sels, ce qui montre que la différence de support de greffage de ces phases stationnaires (silice vierge ou hybride) a un faible impact sur leurs propriétés de sélectivité.

- Les résolutions obtenues avec la colonne XBridge sont légèrement meilleures que celles obtenues avec la colonne TSK gel, notamment à 10 et à 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Cette différence de résolution est particulièrement marquée pour la séparation des complexes Er-EDTA, Gd-EDTA, Er-DTPA et Gd-DTPA, comme le montre, à titre d'exemple, la Figure 38.

- Concernant l'efficacité des colonnes, aucune tendance ne peut être confirmée.

Des conclusions identiques ont été obtenues dans la littérature lors d'une étude comparative des colonnes à fonctions amide TSK gel et XBridge pour la séparation de peptides, de bases azotées et d'acides aminés [133,136]. La rétention plus importante des analytes avec la colonne TSK gel a été attribuée à sa surface spécifique plus importante. Des différences de sélectivité ont aussi été observées et attribuées aux différents degrés d'interactions via des liaisons hydrogène entre les deux colonnes [136].

Afin d'évaluer le rendement de la colonne XBridge et de déterminer si la complexation est totale dans les proportions Ln:ligand 1:1,25, une expérience de récupération de fraction en sortie de cette colonne a été réalisée. À cette fin, cinq échantillons préparés de manière identique contenant du gadolinium à la concentration de  $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  en présence de DTPA dilué dans la phase mobile ont été analysés avec la colonne XBridge (annexe 4). Pour chaque échantillon, trois fractions ont été récupérées : une avant le pic chromatographique, une pendant le pic et une après le pic. Le gadolinium présent dans chaque fraction a ensuite été quantifié par ICP-MS et les taux de récupération ont été calculés. Les données de cette expérience sont présentées dans le Tableau 14 :



Échantillon	Fraction	Concentration (mol.L <sup>-1</sup> )	Rendement de récupération (%)
1	avant	< LOD	99,7
	pendant	9,97.10 <sup>-5</sup>	
	après	< LOD	
2	avant	< LOD	105,1
	pendant	1,11.10 <sup>-4</sup>	
	après	< LOD	
3	avant	< LOD	100,2
	pendant	1,02.10 <sup>-4</sup>	
	après	< LOD	
4	avant	< LOD	98,9
	pendant	9,76.10 <sup>-5</sup>	
	après	< LOD	
5	avant	< LOD	108,4
	pendant	1,13.10 <sup>-4</sup>	
	après	< LOD	

**Tableau 14 : données des récupérations de fraction des échantillons de Gd-DTPA avec [Gd] = 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>. < LOD = inférieur à la limite de détection de l'ICP-MS**

D'après les données de ce tableau, le rendement moyen a été calculé et est de 102 % avec un écart-type de 4 %. Les fractions situées en amont et en aval du pic chromatographique du Gd-DTPA ne contiennent pas de gadolinium. Le rendement de la colonne XBridge peut donc être considéré comme étant de 100% et la complexation dans les proportions 1:1,25 comme totale.

*La colonne XBridge a été sélectionnée pour la suite du développement portant sur l'étude des caractéristiques de rétention des complexes de lanthanides en mode HILIC. La colonne XBridge présente des résolutions plus élevées que la colonne TSK gel et ses propriétés de rétention plus faibles pour une sélectivité équivalente permettent d'envisager des séparations avec des temps d'analyse plus courts. Le rendement de la colonne XBridge est de 100 % et la complexation des lanthanides par les ligands est totale.*

### **3 Caractéristiques de rétention des complexes de lanthanides en mode HILIC**

Les principes régissant les mécanismes de rétention en HILIC sont très complexes et résultent de la combinaison de plusieurs modes de séparation et de plusieurs types d'interactions [24,25]. Les mécanismes dépendent non seulement des caractéristiques de la phase stationnaire, de la nature de l'analyte mais également des paramètres chromatographiques tels que la composition de la phase mobile (proportion

acétonitrile/eau, concentration en sels). Bien que les mécanismes HILIC aient fait l'objet de nombreuses études pour les composés organiques, les informations sur les mécanismes de rétention pour les complexes sont rares. Les mécanismes de rétention des complexes de lanthanides Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) ont été donc étudiés et font l'objet de cette partie. À cette fin, une étude paramétrique systématique a été menée dans laquelle une large gamme de composition de phases mobiles (proportion acétonitrile/eau et concentration en sels) a été criblée. Pour chaque composition de phase mobile, les facteurs de rétention de l'ensemble des complexes Ln-DTPA/EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) ont été déterminés.

### 3-a) Impact de la variation du pourcentage d'acétonitrile

Après la nature de la phase stationnaire, le pourcentage de solvant organique dans la phase mobile est le paramètre ayant le plus d'impact sur la rétention des analytes [37]. L'impact de ce paramètre a été étudié grâce un criblage d'une large gamme de compositions de phase mobile avec un pourcentage d'acétonitrile variant de 40 à 80 %, tous les 5 %. Pour chaque pourcentage d'acétonitrile, la concentration d'acétate d'ammonium est 5, 10, 15, 20 mmol.L<sup>-1</sup> (annexe 4). Les paramètres instrumentaux de l'ESI-MS ont été optimisés pour chaque composition de phase mobile. Chaque expérience a été réalisée trois fois. La Figure 39 présente la variation des facteurs de rétention moyens des complexes de lanthanides en fonction du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile, pour une concentration de 15 mmol.L<sup>-1</sup>.

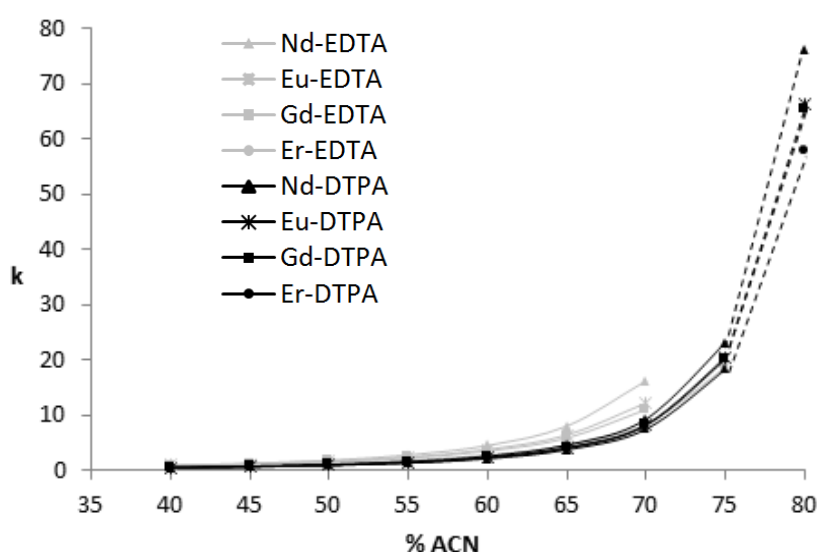


Figure 39 : évolution du facteur de rétention des complexes de lanthanides (Nd, Eu, Gd, Er) en fonction du pourcentage d'acétonitrile. Colonne XBridge (150 x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m),  $[\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$  0,5 % d'acide formique. Débit : 0,15 mL.min<sup>-1</sup>,  $V_{\text{inj}} = 5 \mu\text{L}$ .

Cette figure montre que les facteurs de rétention des complexes augmentent avec le pourcentage d'acétonitrile. Pour les pourcentages d'acétonitrile inférieurs à 40 %, les complexes de lanthanides ne sont pas retenus, en raison de la trop grande force éluante de la phase mobile. Entre 55 % et 75 % d'acétonitrile, les facteurs de rétention augmentent de manière significative et n'ont même pas pu être déterminés pour les complexes Ln-EDTA au-delà de 70 % d'acétonitrile. Concernant les complexes Ln-DTPA, leur facteur de rétention est supérieur à 60 pour 80 % d'acétonitrile, ce qui correspond à des temps de rétention supérieurs à plusieurs heures et un élargissement des pics très important (en pointillé sur la Figure 39). Ces résultats avaient déjà été observés lors de la sélection de la phase stationnaire. L'augmentation des facteurs de rétention des complexes de lanthanides à ligands polyaminocarboxyliques en fonction du pourcentage d'acétonitrile est un comportement caractéristique attendu en mode HILIC. En revanche ce comportement se produit avec des phases mobiles à force éluante plus élevée que celles classiquement utilisées en HILIC [27]. En effet, pour des composés organiques, ce phénomène est généralement observé avec des phases mobiles contenant un pourcentage d'acétonitrile supérieur à 80 % [24,25,28]. L'augmentation des facteurs de rétention de complexes de lanthanides, avec des phases mobiles de force éluante importante, a également été observée dans le cadre de la séparation d'agents de contraste à base de gadolinium, mais avec une phase stationnaire à fonctions zwitterioniques sulfobetaine [118]. Dans cette étude, l'impact de la variation de l'acétonitrile sur la rétention de différents complexes de gadolinium à ligand linéaire, cyclique et macrocyclique a été étudié. Pour 80 % d'acétonitrile, l'ensemble des complexes étaient trop retenus, excepté le complexe de gadolinium le moins polaire contenant un cycle benzénique. Bien que la phase stationnaire de cette étude n'ait pas les mêmes groupements fonctionnels que celle que nous avons utilisée, les pourcentages classiquement utilisés en HILIC ont également conduit à une rétention trop importante des analytes.

Les données de la Figure 39 indiquent également que les complexes Ln-EDTA présentent des facteurs de rétention plus élevés que ceux de Ln-DTPA et sont donc toujours plus retenus. Ceci peut s'expliquer par le fait que la sphère d'hydratation des complexes Ln-EDTA est plus importante que celle des complexes Ln-DTPA [12]. Les complexes d'EDTA sont ainsi plus hydrophiles que ceux de DTPA.

### ***3-b) Impact de la variation de la concentration d'acétate d'ammonium***

L'augmentation de la concentration en sels dans la phase mobile a généralement pour effet de diminuer les interactions électrostatiques entre les analytes chargés et la phase stationnaire et d'accroître le volume de la couche enrichie en eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire [24,26]. Ainsi la variation de la concentration en sels influence la rétention des composés chargés et hydrophiles. Bien que les groupements amide soient neutres, selon le pH de la phase mobile, des silanols résiduels neutres ou déprotonés peuvent induire des interactions électrostatiques répulsives ou attractives entre l'analyte et la phase stationnaire, comme reporté pour de nombreux composés acides ou basiques [29,36,137]. L'impact de la variation de la concentration d'acétate d'ammonium a été étudié pour des concentrations de 5, 10, 15 et 20 mmol.L<sup>-1</sup>. Dans l'ensemble des cas, aucune influence significative de la variation de la concentration en sels sur la rétention des complexes n'a été observée. Par conséquent, dans nos conditions expérimentales, les interactions électrostatiques interviennent très peu dans le mécanisme de rétention des complexes Ln-EDTA et Ln-DTPA avec les phases stationnaires fonctionnalisées par des groupements amide. Le support de greffage de la phase stationnaire à fonctions amide est un matériau hybride, ayant un nombre de silanols à sa surface plus faible par rapport aux phases stationnaires dont le support de greffage est en silice vierge. Ces résultats sont donc très différents de ceux relatifs à l'étude de la rétention des agents de contraste à base de gadolinium sur une phase stationnaire à fonctions zwitterioniques. En effet, celle-ci a montré que les temps de rétention des analytes chargés étaient significativement influencés par la variation de la concentration en sels [118] qui modifie la force des interactions électrostatiques entre les espèces chargées et les groupements ionisés de la phase stationnaire.

Néanmoins, dans notre cas, il a été observé que l'augmentation de la concentration d'acétate d'ammonium de 5 à 20 mmol.L<sup>-1</sup> a diminué l'asymétrie des pics d'élution des complexes de lanthanides.

### ***3-c) Étude des mécanismes de rétention***

En mode HILIC, la rétention des analytes ne peut pas être décrite par un seul mécanisme. Par conséquent, le mécanisme de rétention prédominant des analytes est difficilement prévisible. Afin de déterminer les contributions relatives des mécanismes

de partage et d'adsorption dans la rétention des complexes Ln-DTPA/EDTA avec la colonne XBridge, les équations de ces deux modèles de rétention ont été utilisées. Si le mécanisme de partage est prédominant l'Équation 4 s'applique [24] :

$$\log k = \log k_A - S.\%H_2O$$

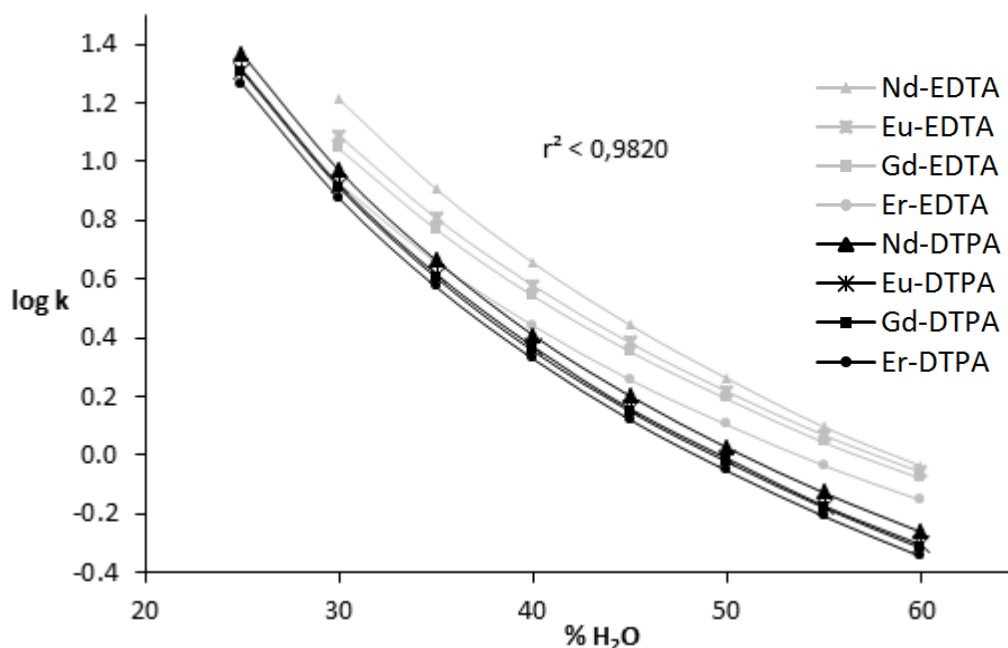
**Équation 4 : équation relative au mécanisme de partage avec  $k_A$  le facteur de rétention hypothétique du composé si la phase mobile est purement organique ;  $S$  une constante prenant en compte la polarité du solvant et la taille de l'analyte.**

Dans le cas où le mécanisme d'adsorption prédomine, la relation devient l'Équation 5 [24] :

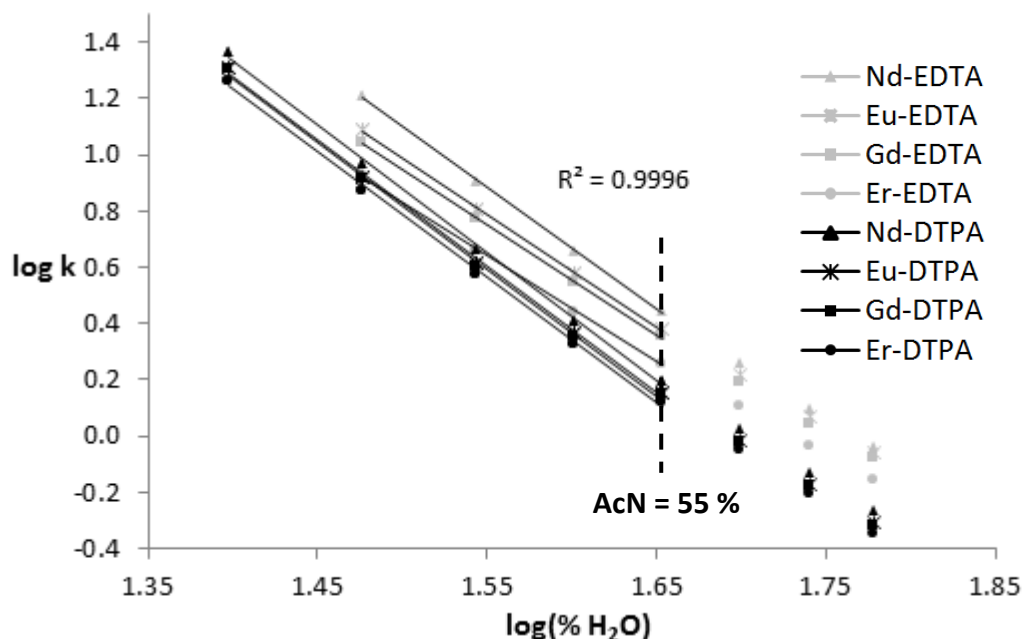
$$\log k = \log k_B - n.\log \%H_2O$$

**Équation 5 : équation relative au mécanisme d'adsorption avec  $k_B$  le facteur de rétention du composé extrapolé pour une phase mobile purement aqueuse ;  $n$  le coefficient stœchiométrique correspondant au nombre de molécules d'eau nécessaires pour déplacer un analyte adsorbé à la surface de la phase stationnaire.**

La Figure 40 et la Figure 41 représentent l'évolution du  $\log k$  en fonction respectivement du pourcentage d'eau (% d' $H_2O$ ) (Figure 40) et du  $\log$  du pourcentage d'eau ( $\log \% H_2O$ ) (Figure 41) pour 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium.



**Figure 40 : évolution du  $\log k$  en fonction du %  $H_2O$  pour les complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Ln = Nd, Eu, Gd, Er) ; colonne XBridge (150 x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m),  $[NH_4CH_3COO] = 15$  mmol.L<sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,15 mL.min<sup>-1</sup>,  $V_{inj} = 5$   $\mu$ L.**



**Figure 41 : évolution du log k en fonction du log % H<sub>2</sub>O pour les complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) ; colonne XBridge (150 x 2,1 mm, 3,5 µm), [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 15 mmol.L<sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique. Débit : 0,15 mL.min<sup>-1</sup>, V<sub>inj</sub> = 5 µL.**

D'après la Figure 40, la faible corrélation linéaire ( $r^2 < 0,982$ ) pour le modèle linéaire décrit par l'Équation 4, démontre une corrélation insuffisante entre les deux variables sur toute la gamme de composition de phase mobile. Une corrélation linéaire inférieure est de plus obtenue avec les complexes Ln-DTPA ( $r^2 \approx 0,96$ ). Des coefficients  $r^2$  similaires sont obtenus quelle que soit la concentration en sels. Ces résultats indiquent donc que le mécanisme de partage n'est pas prépondérant lors de la séparation des complexes Ln-DTPA/EDTA. Dans la littérature, aucune étude ne reporte de tels comportements pour des complexes métalliques ou de lanthanides.

En revanche le modèle linéaire d'adsorption est en adéquation avec les données expérimentales lorsque le pourcentage d'acétonitrile est supérieur à 55 % avec des coefficients de régression linéaires très élevés ( $r^2 \geq 0,999$ ) (Figure 41). Le mécanisme d'adsorption peut être donc considéré comme prédominant pour la séparation des complexes Ln-DTPA/EDTA au-delà de 55 % d'acétonitrile, même si la phase mobile contient une teneur en eau relativement importante. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'ensemble des concentrations en acétate d'ammonium.

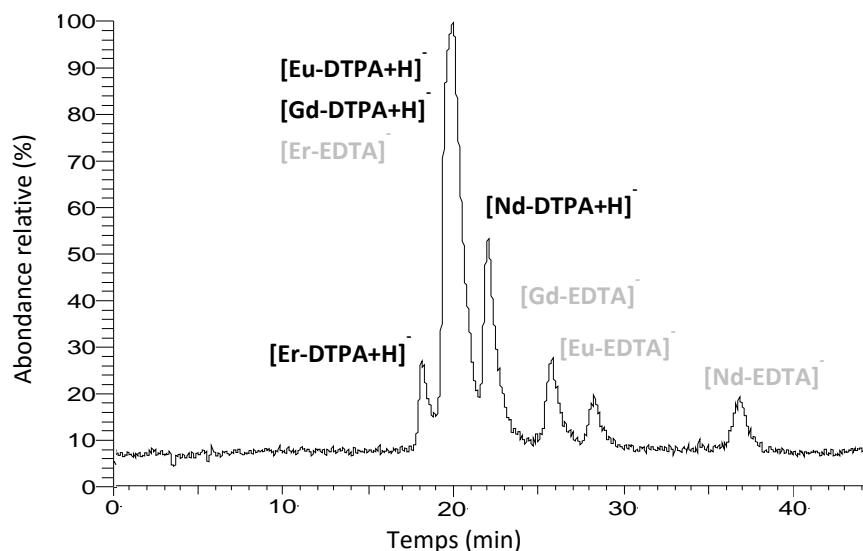
Ces expériences ont également permis de sélectionner une composition de phase mobile pour la suite de notre étude : la proportion acétonitrile/eau ainsi que la concentration d'acétate d'ammonium ont été fixées pour obtenir des facteurs de rétention de l'ordre de 10 et le meilleur compromis entre la symétrie des pics d'élution

et une sensibilité élevée en ESI-MS, à savoir 70/30 (v/v) acétonitrile/eau et 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium. Les paramètres ESI-MS ont également été optimisés et sont présentés dans le tableau suivant :

Paramètres ESI-MS	Valeurs
Mode d'acquisition	fullscan
Tension de spray	- 4 kV
Gaz séchant	60 ua
Gaz auxiliaire	55 ua
Température de vaporisation	300°C
Température du capillaire de transfert	250°C

**Tableau 15 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS optimisés pour la phase mobile 70/30 (v/v) acétonitrile/eau et 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium avec un débit de 0,15 mL.min<sup>-1</sup>**

La Figure 42 présente le chromatogramme de la séparation des complexes Ln-DTPA/EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) en mode isocratique avec la colonne XBridge dans ces conditions (annexe 4).



**Figure 42 : chromatogramme de la séparation des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Nd) en mode isocratique. Colonne XBridge : 150 x 2,1 mm, 3,5 µm. Phase mobile : ACN/H<sub>2</sub>O (70/30) [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 15 mmol.L<sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,15 mL.min<sup>-1</sup>. V<sub>inj</sub> = 5 µL Proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 [Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>**

Ce chromatogramme montre que :

- les complexes de DTPA sont moins retenus que les complexes d'EDTA, ce qui reste en adéquation avec les observations de la Figure 39 ;

- l'ordre d'élution pour les complexes d'EDTA et de DTPA est le même : l'élution s'effectue du complexe de lanthanide le plus lourd, contenant l'erbium, au plus léger, contenant le néodyme et ce, même pour les complexes partiellement co-élus, c'est-à-dire le Gd-DTPA et l'Eu-DTPA ;

- l'ensemble des complexes d'EDTA sont séparés y compris les complexes Gd-EDTA et Eu-EDTA ( $R_s > 1$ ), mettant en évidence une nouvelle fois les différences de propriétés des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA.

*Les facteurs de rétention des complexes de lanthanides augmentent de façon drastique avec le pourcentage d'acétonitrile. En revanche, ce comportement a lieu à partir de 75/25 (v/v) acétonitrile/eau, proportions inférieures à celles typiquement rencontrées en HILIC pour la séparation de composés organiques où le pourcentage d'acétonitrile est proche de 85 %. Les facteurs de rétention des complexes de lanthanides avec la phase stationnaire à fonctions amide ne sont pas influencés par la variation de la concentration d'acétate d'ammonium entre 5 et 20 mmol.L<sup>-1</sup>. L'étude de la rétention des complexes de lanthanides avec cette phase a montré que le mécanisme d'adsorption est prédominant pour des pourcentages d'acétonitrile supérieurs à 55 %. L'ensemble des complexes Ln-EDTA sont séparés et sont plus retenus que les complexes Ln-DTPA. Une co-élution des complexes Gd-DTPA et Eu-DTPA est observée. L'ordre d'élution des complexes d'EDTA et de DTPA est identique, à savoir du complexe de lanthanide le plus lourd au plus léger. La proportion acétonitrile/eau et la concentration d'acétate d'ammonium ont été fixées respectivement à 70/30 (v/v) acétonitrile/eau et 15 mmol.L<sup>-1</sup> pour la suite des expériences.*

#### **4 Vers des conditions d'analyse rapide de type « fast HPLC »**

La diminution des temps d'analyse, des volumes d'échantillons disponibles, de la consommation de solvants et de la production d'effluents sont des problématiques d'intérêt majeur dans le domaine du nucléaire puisque cela permet de limiter notamment l'exposition du personnel aux irradiations et les coûts de traitement des effluents. Plusieurs stratégies sont envisageables pour diminuer les temps d'analyse des composés sans dégrader la séparation. Les supports monolithiques présentent une grande perméabilité favorisant les transferts de masse rapides et présentent une faible résistance aux écoulements à des débits de phase mobile élevés [138]. Une autre possibilité est l'utilisation de colonnes remplies avec des particules superficiellement poreuses, ce qui limite le chemin de diffusion des analytes et ne ralentit pas le transfert de masse quand le débit augmente [33]. Enfin les phases stationnaires remplies de particules sub-2  $\mu\text{m}$  permettent généralement une augmentation du débit sans



diminution de l'efficacité, l'optimum de la vitesse linéaire étant inversement proportionnel à la taille des particules [138]. En revanche l'augmentation du débit contribue dans ce cas, à une augmentation de pression significative nécessitant l'utilisation de pompe analytique résistante aux très hautes pressions. Une grande diversité de phases stationnaires polaires est disponible pour la chromatographie en mode HILIC. En revanche, les phases stationnaires monolithiques et à particules superficiellement poreuses sont beaucoup moins développées en HILIC, contrairement aux phases stationnaires à particules sub-2 µm qui connaissent un développement important ces dernières années [30].

À notre connaissance, une phase stationnaire remplie de particules à porosité superficielle de silice vierge a été utilisée pour la séparation des agents de contraste à base de gadolinium en mode isocratique [113-115]. Une séparation rapide des complexes de gadolinium a été obtenue sans perte d'efficacité et sans augmentation de pression en comparaison avec la phase zwitterionique de type sulfobétaïne traditionnellement employée [113-115].

Dans notre étude, afin de mettre en œuvre des conditions d'analyse rapide pour la séparation des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA, l'utilisation des mêmes conditions de phase mobile et d'une phase stationnaire avec les mêmes propriétés de surface que la colonne analytique XBridge, à savoir un support hybride fonctionnalisé par des groupements amide, peut être envisagée. Seule une phase stationnaire à particules sub-2 µm correspond à ces critères : la colonne Acquity qui a des particules de 1,7 µm de diamètre et une longueur inférieure (100 x 2,1 mm ; 1,7 µm). La longueur de la colonne a été diminuée afin de réduire les phénomènes de dispersion intra-colonne et limiter l'augmentation de la pression. Le débit expérimental obtenu avec la colonne XBridge a été transposé en tenant compte des caractéristiques de la colonne Acquity selon l'Équation 6:

$$D_{Acquity} = D_{Xbridge} \frac{d_{Acquity}^2}{d_{Xbridge}^2} \frac{dp_{Xbridge}}{dp_{Acquity}}$$

**Équation 6 : équation de transfert de débit optimal avec D les débits, di le diamètre interne et dp le diamètre des particules de chaque colonne**

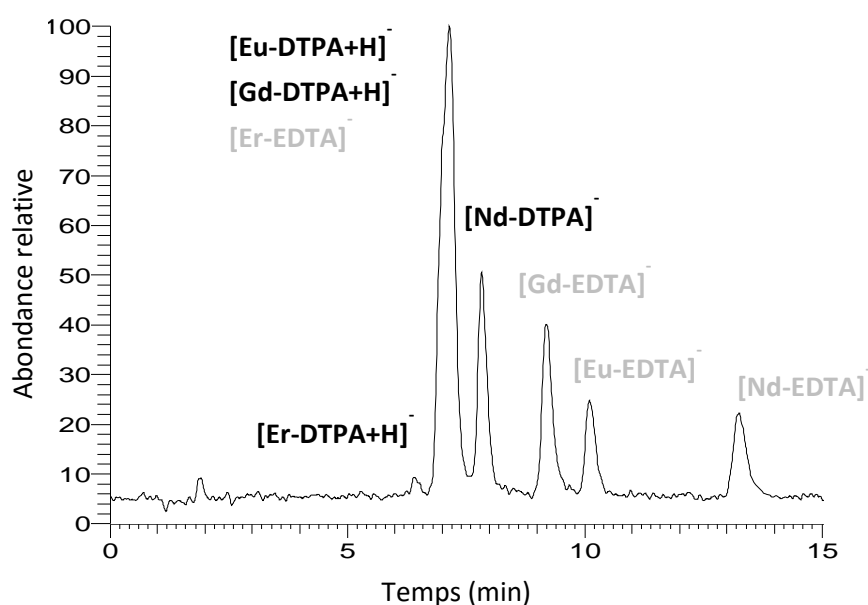
D'après l'Équation 6, le débit optimal de la colonne Acquity est 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. Le système analytique est par ailleurs adapté à ce changement de format en raison du faible volume mort extra-colonne. Les paramètres ESI-MS ont de nouveau été optimisés (annexe 4) et sont présentés dans le tableau suivant :

Paramètres ESI-MS	Valeurs
Mode d'acquisition	fullscan
Tension de spray	- 4 kV
Gaz séchant	70 ua
Gaz auxiliaire	30 ua
Température de vaporisation	420°C
Température du capillaire de transfert	250°C

**Tableau 16 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS optimisés pour la phase mobile 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium et 0,5 % d'acide formique avec un débit de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>**

Afin d'évaluer la performance de la séparation avec chaque colonne, les données chromatographiques ( $k$ ,  $\alpha$ ,  $R_s$  et  $N$ ) des séparations des complexes de lanthanides, présentées en Figure 42 et en Figure 43, ont été calculées et seront présentées dans le Tableau 17.

La Figure 43 présente la séparation des complexes Ln-DTPA/EDTA avec la colonne Acquity en mode isocratique avec une phase mobile contenant 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium et 0,5 % d'acide formique et un débit de 0,3 mL.min<sup>-1</sup> (annexe 4).



**Figure 43 : chromatogramme de la séparation des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) en mode isocratique. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m), 70/30 (v/v) acétonitrile/eau [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 15 mmol.L<sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.  $V_{inj}$  = 3  $\mu$ L; Proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; [Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>**

La Figure 43 montre que l'augmentation du débit et la réduction de la longueur de la colonne permettent la séparation des complexes de lanthanides en moins de 15 minutes. Avec la colonne XBridge (Figure 42), la séparation des analytes est réalisée en 40 minutes environ. Ainsi l'utilisation de la colonne Acquity a permis de diminuer le temps

d'analyse d'un facteur 2,5. Avec un débit de 0,15 mL.min<sup>-1</sup>, la consommation de solvant lors des analyses avec la colonne XBridge est de 6 mL. Avec un débit de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>, la consommation de solvant est de 4,5 mL lors des analyses avec la colonne Acquity. Ces conditions d'analyse permettent donc également une réduction de 25 % de la consommation de solvant et de la production d'effluent, ce qui constitue un avantage supplémentaire. Afin de conserver la même charge d'échantillon le volume d'injection a également été réduit respectivement de 5 µL à 3 µL pour les colonnes XBridge et Acquity. De plus, ceci constitue encore un avantage dans le cadre de l'analyse des futurs échantillons radioactifs.

ACN/H <sub>2</sub> O (70/30) [NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO] = 15 mmol.L <sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique								
Complexes	k		α		Rs		N	
	XBridge	Acquity	XBridge	Acquity	XBridge	Acquity	XBridge	Acquity
Er-DTPA	7,3	7,3	1,1	1,1	0,7	1,0	NC	NC
Gd-DTPA	7,9	8,0	1,0	1,0	0,2	0,3	1094	6746
Eu-DTPA	8,1	8,2	1,0	1,0	0,2	0,3	899	4117
Er-EDTA	8,2	8,3	1,1	1,1	1,2	1,8	2032	4825
Nd-DTPA	9,1	9,2	1,2	1,2	2,0	3,1	1775	NC
Gd-EDTA	10,8	10,9	1,1	1,1	1,2	1,9	1687	3477
Eu-EDTA	11,9	12,1	1,3	1,3	4,2	5,6	NC	8419
Nd-EDTA	15,8	16,2					2878	5726

**Tableau 17 : données chromatographiques de la séparation de complexes Ln-DTPA (Nd, Eu, Gd Er) et de complexes Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd Er) contenus dans un même échantillon. ND = non déterminé ; NC = non calculable. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) ; colonne XBridge (150 x 2,1 mm, 3,5 µm). Les formules appliquées pour le calcul de k, α, Rs et N sont présentées en annexe 3. Les données ont été obtenues par extraction des chromatogrammes des gammes de masse de chaque complexe.**

D'après ce tableau, on peut observer que les complexes de lanthanides présentent les mêmes valeurs de facteurs de rétention et de sélectivité. Ainsi les colonnes XBridge et Acquity ont les mêmes propriétés de sélectivité et de rétention pour la séparation des complexes de lanthanides, les deux colonnes ayant les mêmes propriétés de surface et ne différant réellement que par le diamètre de leurs particules et leur longueur. Les rapports des Rs et des N obtenus entre la colonne Acquity et la colonne XBridge ont montré qu'un gain en résolution et qu'un gain en efficacité, au minimum d'un facteur

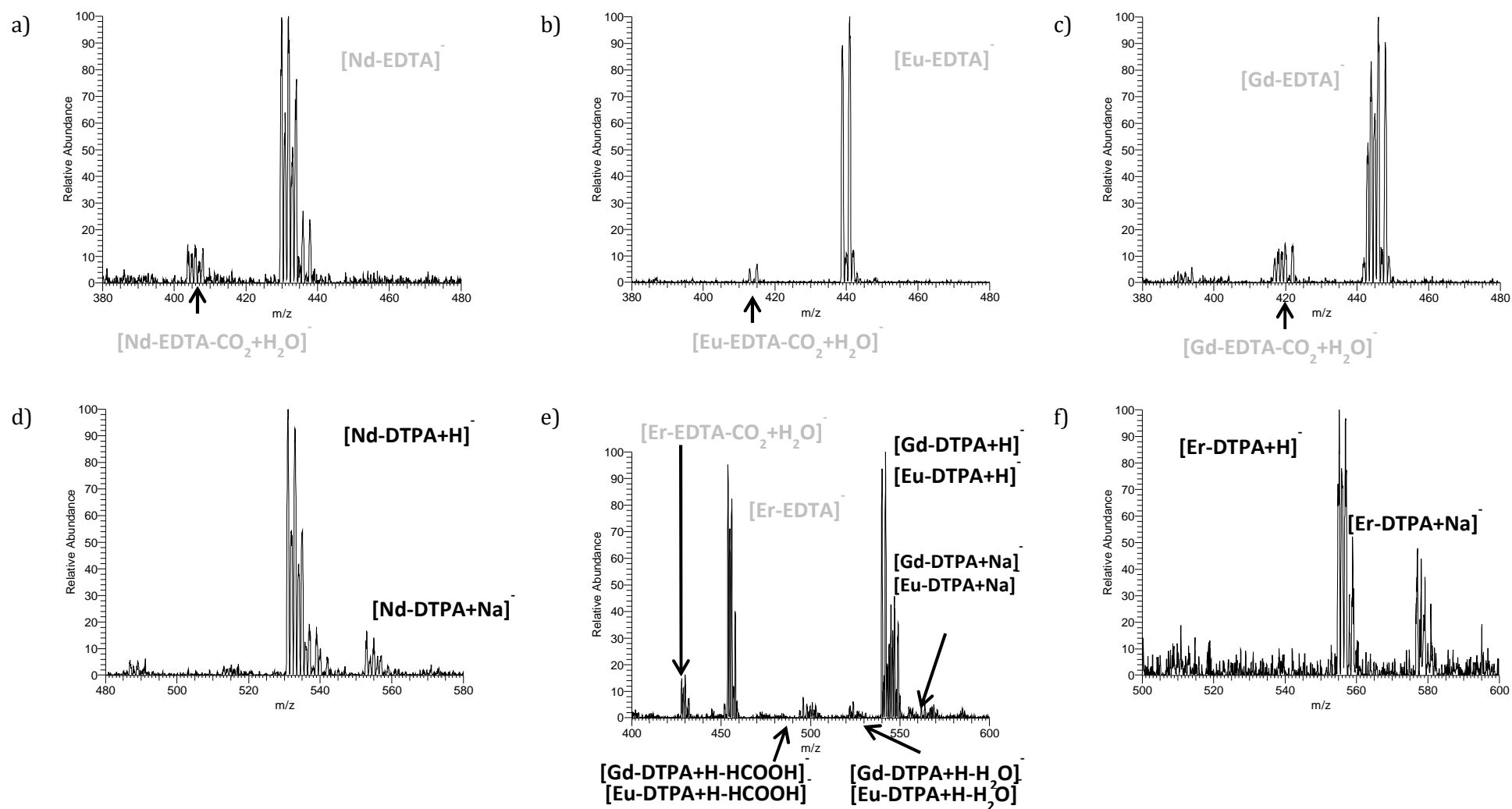
respectivement 1,3 et 1,9, sont obtenus avec la colonne Acquity. Cependant, les composés Gd-DTPA et Eu-DTPA sont toujours partiellement co-élus.

*Comme attendu, des conditions d'analyse plus rapides ont été obtenues avec une colonne Acquity, remplie de particules sub-2  $\mu\text{m}$  et de longueur inférieure à la colonne XBridge. Le débit expérimental obtenu avec la colonne XBridge a été transposé à la colonne Acquity et est de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. La séparation des complexes de lanthanides avec la colonne Acquity dans les mêmes conditions de phase mobile est réalisée en moins de 15 minutes, correspondant à une réduction du temps d'analyse d'un facteur 2,5. L'utilisation de la colonne Acquity permet également d'améliorer la résolution et l'efficacité de la séparation respectivement d'un facteur 1,3 et 1,9. Afin de diminuer la consommation de solvant, le diamètre interne de la colonne peut être réduit. Par ailleurs, la phase stationnaire à fonctions amide est disponible avec des particules superficiellement poreuses en format analytique. Son utilisation pourrait permettre une réduction du temps d'analyse. Cette phase stationnaire existe aussi en format capillaire. Dans ce cas, une diminution de la quantité d'échantillon et de la consommation d'effluent peut être obtenue. Ces deux paramètres sont importants pour l'analyse d'échantillons radioactifs.*

## **5 Identification structurale des complexes de lanthanides**

La spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) permet d'obtenir des informations structurales sur les espèces préalablement séparées, comme la stœchiométrie des complexes et la nature des ligands coordonnés aux lanthanides. Ces informations sont importantes dans le cadre de l'analyse de spéciation, notamment pour la caractérisation d'espèces inconnues dans un échantillon.

Le mode d'ionisation en ESI-MS sélectionné dans notre étude est le mode négatif en raison de la charge des complexes Ln-EDTA dans nos conditions d'étude. Les spectres de masse des complexes de lanthanides, présentés en Figure 44, sont extraits des pics chromatographiques de la séparation présentée Figure 43 avec la colonne Acquity ; les paramètres ESI-MS sont ceux présentés dans le Tableau 16. Le Tableau 18 regroupe les gammes de masses des espèces, fragments et adduits associés.



**Figure 44: Spectres de masse ESI-MS(-) extraits de chaque pic chromatographique de la séparation des complexes Ln-DTPA/EDTA (Nd, Eu, Gd, Nd) en mode isocratique. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7 μm), ACN/H<sub>2</sub>O (70/30) [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 15 mmol.L<sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. V<sub>inj</sub> = 3 μL; proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; [Nd] = [Eu] = [Gd] = [Er] = 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> ; a) complexe Nd-EDTA b) complexe Eu-EDTA c) complexe Gd-EDTA d) complexe Nd-DTPA e) complexes Eu-DTPA, Gd-DTPA, Er-EDTA e) Er-DTPA.**

Espèces	Gamme de masse (m/z)
<b>[Er-DTPA+H]<sup>-</sup></b>	<b>550,9-558,9</b>
[Er-DTPA+Na] <sup>-</sup>	572,9-580,9
[Er-DTPA+K] <sup>-</sup>	588,9-596,9
[Er-DTPA+H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	532,9-540,9
[Er-DTPA+H-HCOOH] <sup>-</sup>	504,9-512,9
<b>[Gd-DTPA+H]<sup>-</sup></b>	<b>540,9-548,9</b>
[Gd-DTPA+Na] <sup>-</sup>	562,9-570,9
[Gd-DTPA+K] <sup>-</sup>	588,9-586,9
[Gd-DTPA+H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	522,9-530,9
[Gd-DTPA+H-HCOOH] <sup>-</sup>	494,9-502,9
<b>[Eu-DTPA+H]<sup>-</sup></b>	<b>539,9/541,9</b>
[Eu-DTPA+Na] <sup>-</sup>	561,9/563,9
[Eu-DTPA+K] <sup>-</sup>	577,9/579,9
[Eu-DTPA+H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	521,9/523,9
[Eu-DTPA+H-HCOOH] <sup>-</sup>	493,9/495,9
<b>[Nd-DTPA+H]<sup>-</sup></b>	<b>531-538,9</b>
[Nd-DTPA+Na] <sup>-</sup>	552,9-561
[Nd-DTPA+K] <sup>-</sup>	568,9-576,9
[Nd-DTPA+H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	512,9-521
[Nd-DTPA+H-HCOOH] <sup>-</sup>	484,9-494,9
<b>[Er-EDTA]<sup>-</sup></b>	<b>449,9-457,8</b>
[Er-EDTA-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	406,0-413,8
[Er-EDTA-CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	423,9-431,9
<b>[Gd-EDTA]<sup>-</sup></b>	<b>439,9-447,9</b>
[Gd-EDTA-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	396-403,9
[Gd-EDTA-CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	413,9-421,9
<b>[Eu-EDTA]<sup>-</sup></b>	<b>438,9/440,9</b>
[Eu-EDTA-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	394,8/396,8
[Eu-EDTA-CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	412,9/414,9
<b>[Nd-EDTA]<sup>-</sup></b>	<b>429,9-437,9</b>
[Nd-EDTA-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	385,8-393,9
[Nd-EDTA-CO <sub>2</sub> +H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	403,9-411,9

**Tableau 18 : récapitulatif des ions identifiés en ESI-MS en mode d'ionisation négatif lors de la séparation des complexes de lanthanides avec la colonne Acquity. Les gammes de masses en gras correspondent aux espèces majoritaires.**

Ces données montrent que l'ensemble des complexes a une stœchiométrie 1:1 en accord avec les données de la littérature [15,16]. Comme précisé au début de ce chapitre, les espèces présentes dans nos conditions expérimentales sont les espèces [Ln-DTPA]<sup>2-</sup> et [Ln-EDTA]<sup>-</sup>. Les complexes de lanthanides majoritairement détectés sont : [Ln-DTPA+H]<sup>-</sup> et [Ln-EDTA]<sup>-</sup>. Les complexes Ln-DTPA sont également détectés sous forme d'adduits sodium et potassium. Concernant les études de spéciation, la caractérisation du complexe Eu-DTPA a essentiellement été décrite en milieu totalement aqueux à

différent pH en mode d'ionisation négatif, par injection directe avec un ESI-MS triple quadripôle [139,140]. Le complexe Eu-DTPA a alors été majoritairement détecté sous sa forme di-chargée et minoritairement sous sa forme monochargée avec un adduit hydrogène. Dans notre étude, la caractérisation des complexes a été réalisée en phase hydro-organique avec 0,5 % d'acide formique, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium. Les différences de phase mobile expliquent vraisemblablement les différences de formes détectées. Concernant la caractérisation des complexes Ln-EDTA, aucune étude de leur structure n'est reportée à notre connaissance.

## **6 Conclusion**

La séparation et la caractérisation des complexes de différents lanthanides coordonnés par divers ligands polyaminocarboxyliques, Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er), par chromatographie en mode HILIC couplée à l'ESI-MS a été mise au point pour la première fois en mode isocratique. Si les phases stationnaires à fonctions cyano, zwitterioniques et diol réticulé présentent une sélectivité insuffisante pour séparer les complexes de lanthanides qui sont tous co-élus, la phase stationnaire fonctionnalisée par des groupements amide permet la séparation partielle des complexes de lanthanides. Les interactions entre les analytes et la phase stationnaire ont donc un rôle important lors de la séparation de ces complexes dans nos conditions expérimentales.

Une étude comparative de deux phases stationnaires fonctionnalisées par des groupements amide présentant des supports de greffage différents a été réalisée. Les complexes de lanthanides sont plus retenus avec la phase stationnaire à support en silice vierge (TSK gel 80), tandis que de meilleures résolutions et de meilleures efficacités de séparation ont été obtenues avec la phase stationnaire à support de greffage hydride (XBridge). Le rendement de la colonne XBridge a été évalué et est de 100 % ; la complexation dans les proportions lanthanides:ligands 1:1,25 est totale.

L'étude des mécanismes de rétention des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) a montré que les interactions électrostatiques ont peu d'influence sur la rétention de ces complexes et que le mécanisme d'adsorption est prédominant pour des pourcentages d'acétonitrile supérieurs à 55 %. Ainsi malgré l'absence d'interactions électrostatiques, la fonctionnalisation de la phase stationnaire joue néanmoins un rôle et les groupements amide se sont avérés ceux donnant les meilleures sélectivités.

Dans l'objectif de diminuer le temps d'analyse et la consommation de solvant, la séparation dans des conditions d'analyse plus rapides en diminuant la longueur et la

granulométrie de la colonne a été mise en œuvre. Ces diminutions ont induit une réduction du temps d'analyse d'un facteur 2,5 et de 25 % de la consommation de solvant. De plus, la résolution ainsi que l'efficacité de la séparation ont été améliorées respectivement d'un facteur 1,3 et 1,9 avec la phase stationnaire Acquity. Ces conditions d'analyse plus rapides seront utilisées pour la suite des développements.

Pour l'analyse de spéciation des lanthanides, la caractérisation structurale en ESI-MS des complexes de lanthanides a été réalisée et a confirmé la stœchiométrie 1:1 connue de ces complexes.

L'étape ultérieure sera consacrée à l'évaluation avec ce système des limites de détection et de quantification ainsi qu'à la détermination des domaines de linéarité du signal en ESI-MS, pour une caractérisation et une quantification de complexes de lanthanides d'intérêt pour le cycle du combustible nucléaire par HILIC ESI-MS. Dans une dernière étape, le couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC à l'ESI-MS et l'ICP-MS sera mis en œuvre permettant la mise au point d'une méthode de quantification simultanée.





# **Chapitre IV**

## **Quantification de complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS**

La quantification d'espèces contenues dans un échantillon est un des aspects majeurs de l'analyse de spéciation. Ce chapitre présente ainsi la mise au point d'une première méthode de quantification de complexes de lanthanides à ligands polyaminocarboxyliques par HILIC ESI-MS. Tout d'abord, les précautions requises dans le cadre d'une analyse de spéciation quantitative par ESI-MS sont exposées. En effet, si les procédures de quantification de composés organiques par ESI-MS sont largement décrites et validées dans la littérature, les complexes métalliques sont plus rarement quantifiés par cette technique. La suite de ce chapitre est consacrée à la description de la méthode de quantification développée. Le mode d'acquisition en ESI-MS et le type d'étalonnage sélectionnés sont décrits. Ensuite les performances analytiques, à savoir les limites de détection et de quantification des complexes de lanthanides, le domaine de linéarité, la justesse et la stabilité de la mesure du signal en ESI-MS ont été déterminées sur des échantillons modèles. Enfin des premières mesures isotopiques par ESI-MS ont été réalisées afin d'évaluer les performances de l'ESI-MS pour ce type de mesures, notamment en vue de la mise en œuvre d'approches de quantification par dilution isotopique.

## **1 Analyse de spéciation quantitative par ESI-MS**

Les méthodes de quantification par ESI-MS en injection directe ou par LC ESI-MS sont très répandues pour quantifier des molécules organiques jusqu'à des concentrations de l'ordre de  $10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup> selon les espèces et le type d'instrument. Les domaines de quantification s'étendent généralement sur 2 à 3 ordres de grandeur en concentration [141]. En revanche, la quantification de complexes métalliques ou de lanthanides par ESI-MS est délicate et sa mise en œuvre nécessite la prise en compte de certaines considérations :

- les complexes d'intérêt doivent être stables en phase gazeuse lors de l'étape de désolvatation ou du moins, le système ligand-métal ne doit pas être cinétiquement labile par rapport au processus d'électro-nébulisation ( $10^{-2}$ s) [142]. De plus, la formation d'adduit et de fragment doit être la plus faible possible afin de ne pas modifier artificiellement la concentration de l'analyte d'intérêt ;

- le rendement d'ionisation d'un composé diffère selon la nature du complexe (stœchiométrie, charge...) et la réponse en ESI-MS peut être différente selon les espèces à analyser. La quantification d'un composé doit être réalisée par le biais d'un étalonnage basé sur le même composé en raison de la variabilité des rendements d'ionisation.

Néanmoins, pour des complexes de structure proche, les rendements d'ionisation peuvent être considérés comme identiques. Par ailleurs, en raison de l'absence de matériaux de référence certifiés adaptés à la quantification de complexes par ESI-MS et par LC ESI-MS, les résultats doivent être validés par le biais d'une approche alternative [143] ;

- de forts effets de matrice peuvent être observés en ESI-MS pouvant conduire à de la suppression de signal notamment lorsque la force ionique de l'échantillon est élevée. L'ajout de solvant organique peut être parfois nécessaire pour améliorer le signal des analytes [142].

Lors de l'optimisation des conditions d'ionisation, ces considérations sont à prendre en compte afin d'obtenir des signaux par ESI-MS optimaux, comme notamment la minimisation de la fragmentation des analytes.

De nombreuses revues décrivent l'emploi de l'ESI-MS pour des études de spéciation [66,142-145]. L'ESI-MS est largement utilisée notamment pour la caractérisation d'interactions métaux-ligands, la détermination de constantes de complexation et de stabilité de complexes métalliques [146-153] mais également de lanthanides et d'actinides [139,140,154-166]. Dans ce dernier cas, la majeure partie des études ont été réalisées par ESI-MS en injection directe avec des ligands d'intérêt pour le cycle de retraitement du combustible [140,162-165]. Par ailleurs, l'utilisation d'une technique d'analyse complémentaire, comme notamment la spectroscopie laser résolue en temps (SLRT), est décrite dans certaines études afin de valider les résultats obtenus par ESI-MS [139,166].

Les études quantitatives d'espèces de lanthanides par HPLC couplée à l'ESI-MS sont beaucoup moins nombreuses [117] en raison des difficultés supplémentaires liées à la séparation chromatographique. En effet, celle-ci ne doit pas modifier la distribution des espèces à analyser. Certains complexes labiles peuvent se dissocier lors de la séparation chromatographique, ce qui empêche leur quantification [142,143]. Dans ces cas, une autre méthode de séparation doit alors être envisagée.

Dans le cadre des analyses de spéciation des lanthanides, une seule étude décrit le développement par HILIC ESI-MS d'une méthode de quantification d'agents de contraste à base de gadolinium [117]. Dans cette étude, une méthode de quantification complémentaire par ICP-OES est d'ailleurs mise en place. Les autres études de

quantification, dans le domaine de l'analyse de spéciation des lanthanides, décrivent essentiellement le couplage HILIC ICP-MS [113-115,118-120,167].

Concernant notre étude, les complexes de lanthanides à ligands DTPA et EDTA présentent des constantes de complexation élevées, généralement supérieures à  $10^{15}$  (chapitre I). Leur dissociation au cours de la séparation est par conséquent peu probable comme l'ont montré les expériences de récupération de fractions présentées dans le précédent chapitre. Par ailleurs, lors de la mise au point de la méthode de quantification, les fragments et adduits observés lors de la caractérisation des complexes de lanthanides seront à prendre en compte pour le calcul de la concentration des complexes de lanthanides.

## **2 Système d'étude**

Le système d'étude est basé sur un échantillon témoin, composé de deux lanthanides d'intérêt pour le cycle du combustible nucléaire usé, le samarium et le néodyme, en présence de DTPA et d'EDTA. Ces éléments présentent des interférences isobariques naturelles (isotopes de mêmes masses) (Tableau 19).

Masse des isotopes	Abondance des isotopes de l'élément (%)	
	Samarium (Sm)	Néodyme (Nd)
142		27,16
143		12,18
144	3,07	23,83
145		8,3
146		17,17
147	14,99	
148	11,24	5,74
149	13,82	
150	7,38	5,62
152	26,75	
154	22,75	

**Tableau 19 : isotopes du samarium et du néodyme avec leur abondance isotopique naturelle respective [168]**

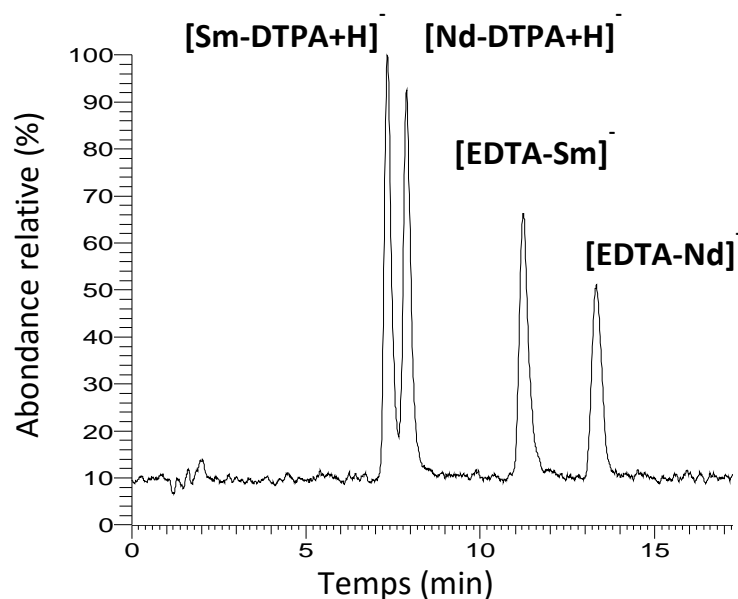
Afin de caractériser ces espèces de lanthanides, leur séparation est nécessaire. La méthode de séparation mise au point au chapitre III avec la colonne Acquity dans les conditions de phase mobile ajustées est utilisée au cours de ce chapitre. Un excès de ligands est introduit dans l'échantillon, conformément aux conditions des procédés de traitement du combustible usé. La proportion lanthanides:DTPA:EDTA est de 2:0,75:1,75. Ces proportions sont donc identiques à celles utilisées précédemment à savoir lanthanides:ligands totaux 1:1,25 ; seule la proportion d'un ligand par rapport à

l'autre est différente. Le pH des échantillons est fixé à 3,2, pH représentatif des phases aqueuses réelles rencontrées dans ces procédés. Les échantillons sont préparés dans la phase mobile (annexe 4). Les complexes de samarium et de néodyme avec l'EDTA et le DTPA sont de stœchiométrie 1:1 et respectivement mono et dichargés,  $[\text{Ln-EDTA}]^-$  et  $[\text{Ln-DTPA}]^{2-}$  avec EDTA et DTPA représentant les formes des ligands entièrement déprotonées. Les complexes de lanthanides seront notés par la suite Ln-EDTA et Ln-DTPA. Les logarithmes des constantes de complexation de ces complexes sont respectivement de 16,51, de 17,06, de 21,6 et de 22,34 pour les complexes Nd-EDTA, Sm-EDTA, Nd-DTPA et Sm-DTPA.

La Figure 45 présente la séparation de l'échantillon test, obtenue par HILIC ESI-MS, pour une concentration en lanthanide total de  $2.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  ( $[\text{Nd}] = [\text{Sm}]$ ) avec la phase stationnaire à fonctions amide (Acquity; 100 x 2,1mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) et la phase mobile sélectionnée au chapitre précédent (70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique) (annexe 4). Les paramètres de l'ESI-MS ont été optimisés pour que les conditions d'ionisation génèrent le moins de fragments et d'adduits possible et sont présentés dans le Tableau 38:

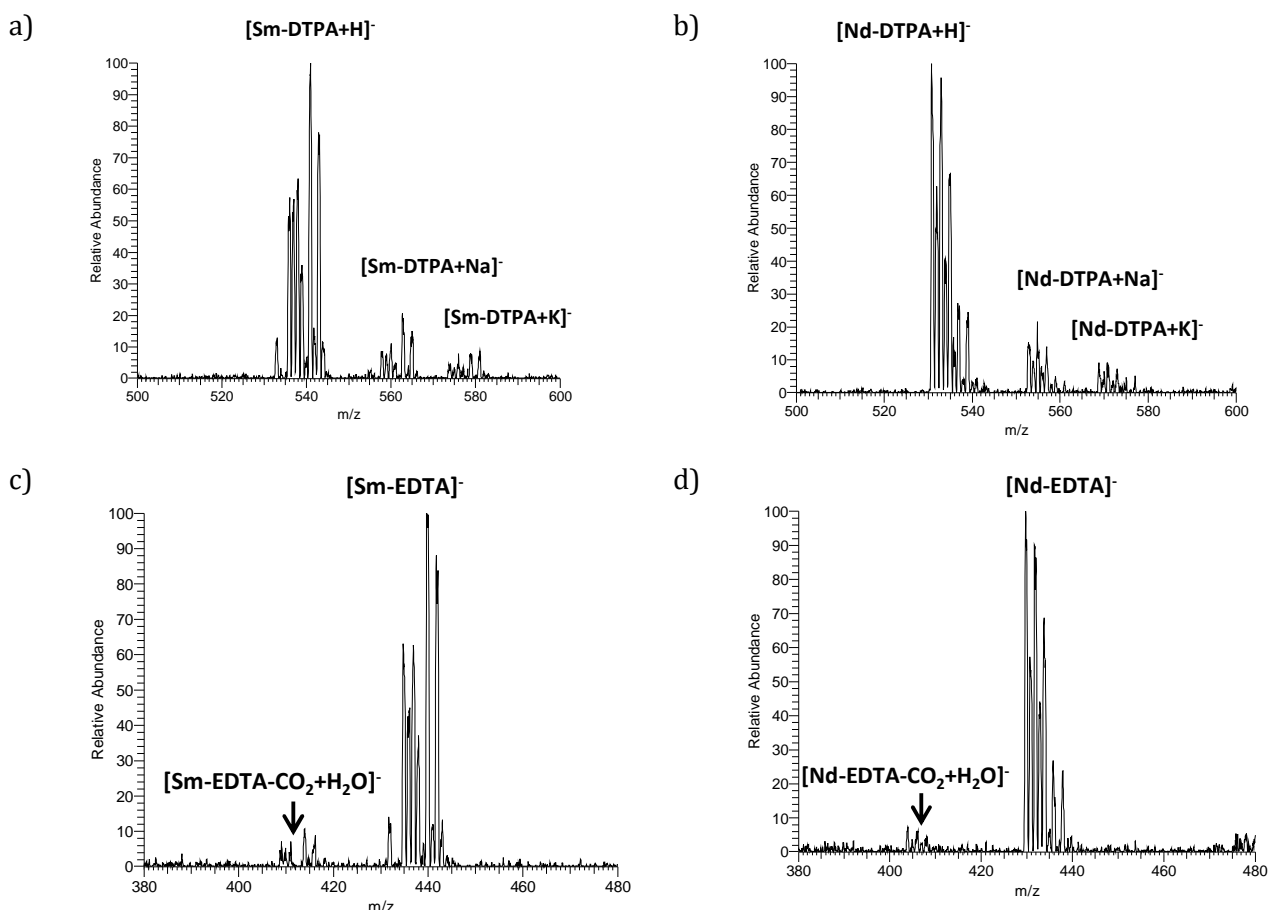
Paramètres ESI-MS	Valeurs
Mode d'acquisition	fullscan
Tension de spray	- 4 kV
Gaz séchant	70 ua
Gaz auxiliaire	35 ua
Température de vaporisation	400°C
Température du capillaire de transfert	250°C

**Tableau 20 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS**



**Figure 45 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA.**  
 Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), 70/30 (v/v) ACN/H<sub>2</sub>O ;  $[\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}] = 15 \text{ mmol.L}^{-1}$  ; 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.  $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$ ; proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ;  $[\text{Sm}] = [\text{Nd}] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

La Figure 45 montre que l'ensemble des complexes Sm-DTPA, Nd-DTPA, Sm-EDTA et Nd-EDTA sont séparés. Comme observé précédemment, les complexes de DTPA sont moins retenus que les complexes d'EDTA. Le complexe de néodyme, plus léger, est toujours le complexe le plus retenu quel que soit le ligand. La caractérisation structurale des complexes a été réalisée. Les spectres de masse associés à chaque pic chromatographique sont présentés en Figure 46 et les gammes de masse respectives de chaque massif sont regroupées dans le Tableau 21.



**Figure 46 : spectres de masse ESI-MS en mode d'ionisation négatif extraits de chaque pic chromatographique de la séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA en mode isocratique. a) complexe Sm-DTPA b) complexe Nd-DTPA c) complexe Sm-EDTA d) complexe Nd-EDTA.**

Espèces	Gamme de masse (m/z)
$[Sm-DTPA+H]^-$	<b>533,0-544,9</b>
$[Sm-DTPA+Na]^-$	554,9-568,0
$[Sm-DTPA+K]^-$	570,9-584,0
$[Nd-DTPA+H]^-$	<b>531-538,9</b>
$[Nd-DTPA+Na]^-$	552,9-561
$[Nd-DTPA+K]^-$	568,9-576,9
$[Sm-EDTA]^-$	<b>431,9-443,9</b>
$[(Sm-EDTA)-CO_2+H_2O]^-$	406,0-417,9
$[Nd-EDTA]^-$	<b>429,9-437,9</b>
$[(Nd-EDTA)-CO_2+H_2O]^-$	403,9-411,9

**Tableau 21 : récapitulatif des ions identifiés en ESI-MS en mode d'ionisation négatif. Les gammes de masse en gras correspondent aux espèces majoritaires.**

Comme indiqué dans la Figure 46, les complexes de DTPA, négatifs et dichargés, sont observés sous formes d'adduits monochargés associés à des protons, des ions sodium et potassium tandis que pour les complexes d'EDTA, négatifs et monochargés, aucun adduit est observé. Aucun fragment de complexes DTPA n'est observé. Pour les



complexes d'EDTA, un seul fragment est observé :  $[(\text{Nd-EDTA})\text{-CO}_2\text{+H}_2\text{O}]^-$ . Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au chapitre III.

### **3 Développement d'une méthode de quantification des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS**

#### ***3-a) Type d'étalonnage***

Plusieurs approches de quantification existent et peuvent être mises en œuvre dans cette étude :

- l'étalonnage externe sans étalon interne : différents échantillons de concentration connue en analyte sont analysés. La réponse de l'analyte mesurée par l'instrument est alors reliée à la concentration par une équation, généralement linéaire. Une droite d'étalonnage est ainsi obtenue. Cette droite permet alors de déterminer la concentration de l'analyte dans les échantillons par la mesure de la réponse de celui-ci avec l'instrument [141] ;

- l'étalonnage externe avec étalon interne : en plus de réaliser une droite de calibration, une quantité déterminée et fixe d'une espèce est introduite dans tous les échantillons de concentrations connues et inconnues. Cette espèce est un étalon interne et permet une normalisation de la mesure de l'instrument. Cette méthode de quantification permet de réduire les incertitudes introduites par la fluctuation du signal au cours d'une analyse et également de compenser les dérives instrumentales au cours du temps [141] ;

- les ajouts dosés : cette méthode repose sur l'ajout de volumes croissants d'analytes en concentration connue directement dans l'échantillon à analyser. Les différentes mesures du signal des échantillons permettent d'obtenir une droite en fonction des concentrations ajoutées dans l'échantillon. L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses correspond à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Cette méthode permet de s'affranchir notamment des effets de matrice ; [141]

- la dilution isotopique : cette méthode est basée sur la mesure de rapport isotopique d'isotopes d'éléments et permet d'atteindre des résultats avec de faibles niveaux d'incertitudes. Cette technique repose sur l'ajout à l'échantillon d'une quantité connue de « traceur » composé de l'espèce ou de l'élément à analyser mais de composition isotopique différente [169]. Dans le cadre des études de spéciation, la dilution isotopique peut être mise au point de deux manières :

- soit par l'ajout d'une espèce « traceur » avant la séparation chromatographique, on parle de dilution isotopique spécifique ;

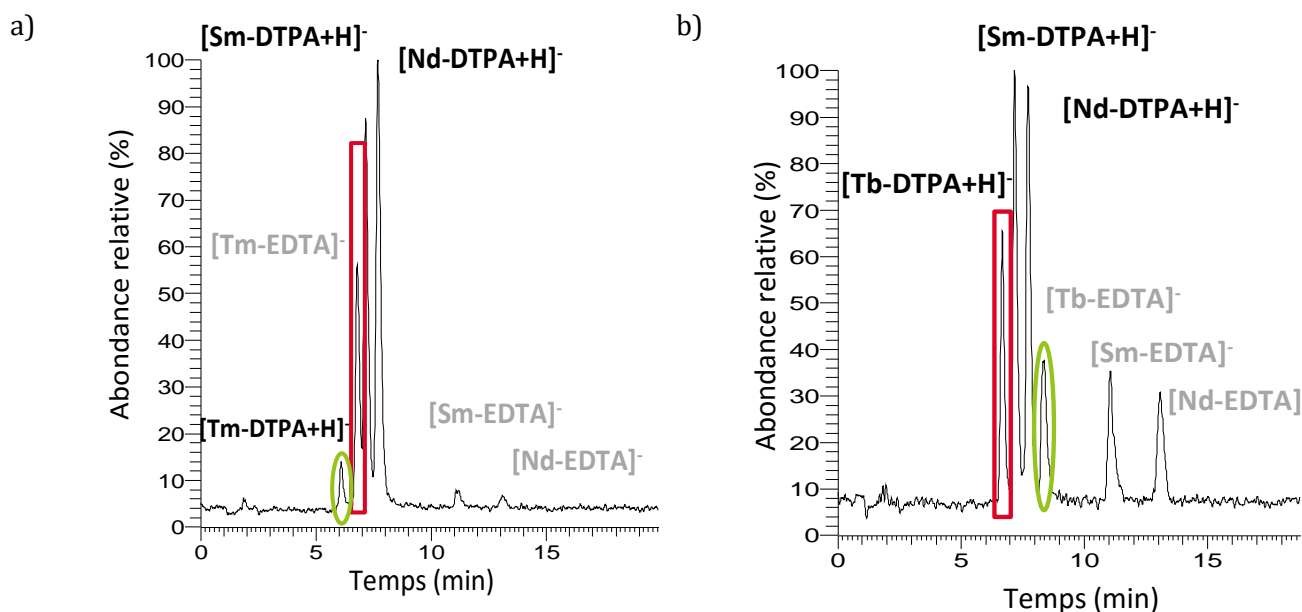
- soit par l'ajout d'un élément « traceur » identique à celui contenu dans l'espèce après la séparation chromatographique, on parle alors de dilution isotopique non spécifique.

Ces méthodes de quantification par dilution isotopique nécessite de mesurer de manière précise la composition isotopique des espèces en solution, traceur(s) et espèce(s) à quantifier. La concentration de l'échantillon est déterminée grâce aux rapports isotopiques de l'isotope enrichi par rapport à un isotope non enrichi dans l'échantillon, dans le traceur et dans le mélange des deux [169]. Parmi l'ensemble de ces méthodes de quantification, celle par dilution isotopique est reconnue comme permettant d'obtenir les meilleures performances analytiques. Le développement d'une méthode de quantification par dilution isotopique est l'objectif à long terme de nos travaux.

Dans le cadre du développement d'une première méthode de quantification par HILIC ESI-MS, une méthode de quantification simple a été mise au point. Ainsi un étalonnage externe avec étalon interne a tout d'abord été sélectionné. L'étalon interne sélectionné doit être de structure voisine des espèces à quantifier afin que son rendement d'ionisation soit similaire à ceux des analytes. Il doit également ne pas être présent dans les échantillons et les matrices susceptibles d'être analysés. Il doit également ne pas modifier le système d'étude. L'étalon interne doit être séparé des autres complexes ou ne pas présenter d'interférences isobariques avec d'autres espèces.

Nous avons décidé de tester quatre étalons internes : deux étalons de complexes de DTPA et deux étalons de complexes d'EDTA. Les lanthanides sélectionnés sont le thulium (Tm) et le terbium (Tb). Ces lanthanides sont mono-isotopiques, n'interfèrent pas avec le samarium et le néodyme et ne sont pas présents dans les échantillons. Différents essais ont été entrepris pour sélectionner ces étalons internes.

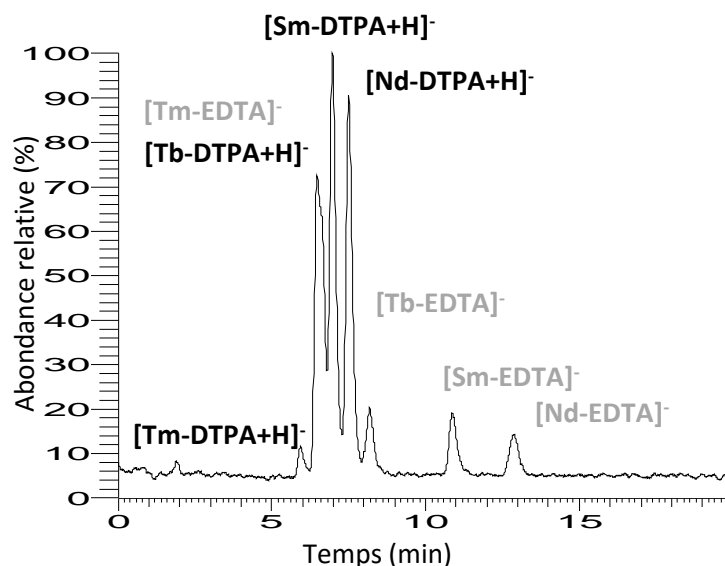
Tout d'abord, deux essais ont été réalisés avec l'échantillon test. Par essai, deux étalons ont été ajoutés à cet échantillon dans les proportions lanthanide:ligand 1:1,25 avec une concentration en lanthanide de  $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> chacun (annexe 4). Le premier essai a consisté à ajouter les étalons Tm-DTPA et Tm-EDTA (Figure 47a) et le deuxième essai, les étalons Tb-DTPA et Tb-EDTA (Figure 47b).



**Figure 47 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec a) les étalons de Tm b) les étalons de Tb. Conditions chromatographiques voir Figure 45**  
**[Sm] = [Nd] = [Tm] = [Tb] =  $1.10^{-4}$  mol.L $^{-1}$ . Ellipse verte : étalon sélectionné ; rectangle rouge : étalon rejeté**

La Figure 47 montre que les complexes Tm-EDTA et Tb-DTPA sont partiellement co-élués avec les complexes de Sm-DTPA ; ils n'ont pas été choisis comme étalons internes. En revanche, les complexes Tm-DTPA et Tb-EDTA sont séparés des autres complexes, ils peuvent donc être utilisés comme étalons internes. Cependant, la distribution entre les complexes de samarium ainsi que celle entre les complexes de néodyme est différente entre les essais sans et avec étalon, comme le montre la variation des aires de pics correspondants (Figure 47 a et b). La répartition des espèces de samarium et de néodyme a donc été modifiée par l'introduction d'un étalon interne.

Ceci a été confirmé lors de l'essai suivant dans lequel uniquement les étalons Tm-DTPA et de Tb-EDTA sélectionnés ont été ajoutés dans l'échantillon test dans les proportions lanthanide:ligand 1:1,25 avec une concentration en lanthanide de  $1.10^{-4}$  mol.L $^{-1}$  chacun (annexe 4) (Figure 48).

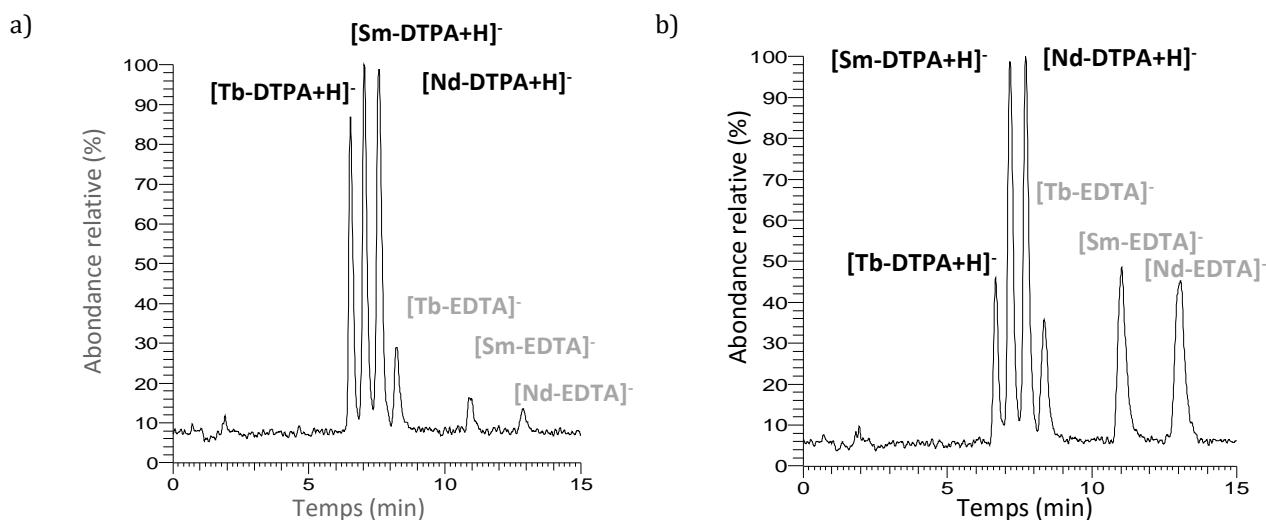


**Figure 48 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec les étalons de Tm-DTPA et Tb-EDTA. Conditions chromatographiques voir Figure 45.**

$$[\text{Sm}] = [\text{Nd}] = [\text{Tm}] = [\text{Tb}] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

En effet, comme le montre la Figure 48, les complexes Tm-EDTA et Tb-DTPA sont également formés lorsque les complexes Tb-EDTA et Tm-DTPA sont utilisés comme étalons internes. De plus, la répartition des complexes de samarium et de néodyme est modifiée.

Nous avons donc décidé de n'utiliser plus qu'un seul étalon interne, choisi parmi les complexes de terbium. La Figure 49 présente deux essais avec l'ajout de Tb-DTPA (Figure 49a) et de Tb-EDTA (Figure 49b) dans l'échantillon test.



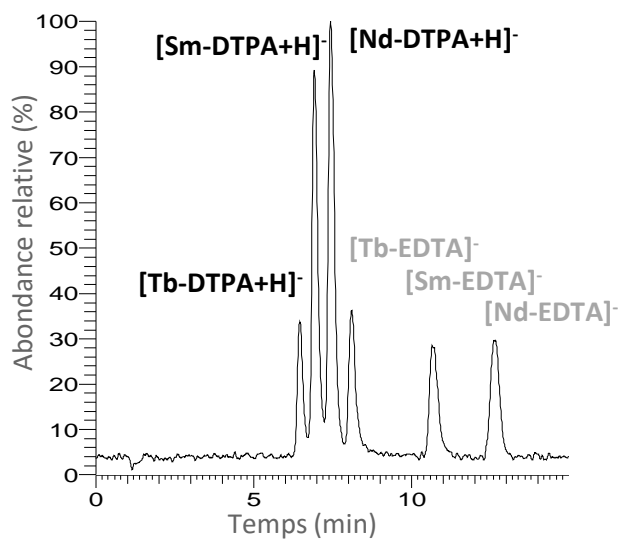
**Figure 49 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec a) l'étalon de Tb-DTPA b) l'étalon de Tb-EDTA. Conditions chromatographiques voir Figure 45**

$$[\text{Sm}] = [\text{Nd}] = [\text{Tb}] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$$

D'après cette figure, on remarque que les complexes Tb-EDTA et Tb-DTPA ont été formés respectivement lors de l'ajout d'un étalon interne de Tb-DTPA et Tb-EDTA. De

plus, la répartition des complexes de samarium et de néodyme est toujours modifiée surtout lors de l'ajout de l'étalon de Tb-DTPA. Une explication à ces phénomènes serait que l'excès de ligand introduit avec l'étalon interne modifierait la spéciation, notamment avec l'excès de DTPA dont les constantes de complexation avec l'ensemble des lanthanides sont plus élevées que celles des lanthanides avec l'EDTA.

Ainsi un essai d'ajout d'étalon interne de Tb-DTPA en proportion 1:1,1 dans l'échantillon test a été réalisé (Figure 50).

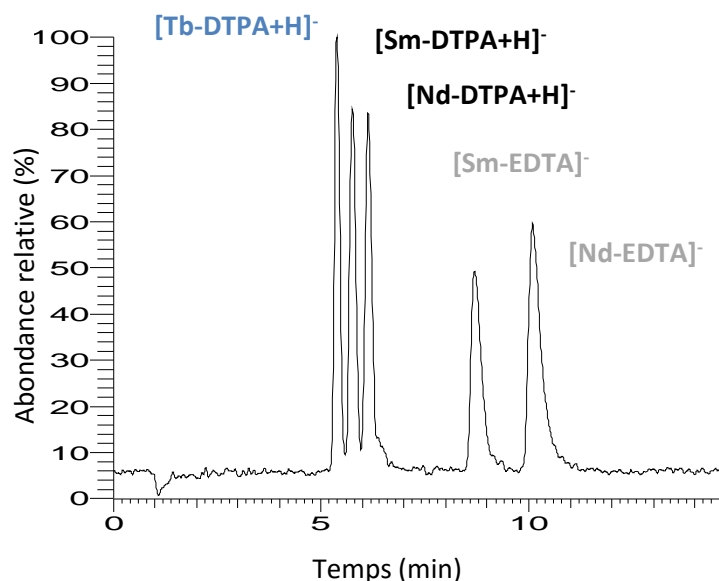


**Figure 50 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec l'étalon de Tb-DTPA. Conditions chromatographiques voir Figure 45**  
 $[Sm] = [Nd] = [Tb] = 1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

Malgré la constante de complexation plus élevée du complexe Tb-DTPA (21,71) par rapport à celle du complexe de Tb-EDTA (17,87), le complexe Tb-EDTA a été formé lors de l'ajout de l'étalon Tb-DTPA dans l'échantillon test. De plus, la distribution des complexes de samarium et de néodyme à ligands DTPA et EDTA est toujours modifiée.

Ainsi dans nos conditions expérimentales, l'utilisation des complexes Tb-DTPA, Tm-DTPA, Tb-EDTA et Tm-EDTA comme étalon interne est impossible. Une explication potentielle serait que, lors de l'ajout d'une espèce en solution, un équilibre avec l'ensemble des espèces en solution s'effectue malgré les valeurs élevées des constantes de complexation des complexes de lanthanides.

Par ailleurs, nous avons voulu déterminer l'impact du pH de l'échantillon et de la phase mobile sur l'ajout d'un étalon interne. Un essai d'addition d'un étalon interne Tb-DTPA dans un échantillon test a été réalisé en ajustant le pH de l'échantillon et de la phase mobile à pH 6,8 (Figure 51) (annexe 4).



**Figure 51 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA avec les étalons de Tb-DTPA à pH 6,8. Conditions chromatographiques voir Figure 45 ; [Sm] = [Nd] = [Tb] =  $1.10^{-4}$  mol.L $^{-1}$**

D'après la Figure 51, lors de l'ajout de l'étalon Tb-DTPA, le complexe Tb-EDTA n'est pas formé. La distribution des complexes de samarium et de néodyme n'est par ailleurs pas modifiée. Ainsi le pH semble influencer les équilibres de distribution des complexes dans l'échantillon.

Dans le cadre de l'analyse de spéciation des lanthanides dans d'autres matrices ayant un pH plus élevé comme les matrices environnementales ou biologiques, un étalonnage interne peut donc être envisagé. Dans notre cas en revanche, le pH de la phase mobile étant imposé par le pH acide des phases aqueuses des procédés de traitement du combustible usé, nous ne pourrions pas modifier le pH afin de mettre en place une méthode de quantification avec un étalon interne.

Cependant dans la littérature, deux études reportent l'utilisation de complexes de lanthanides comme étalon interne pour la quantification d'agents de contraste à base de gadolinium par HILIC ESI-MS [117] et par HILIC ICP-MS [120]. Ces études ont respectivement été menées à pH 3,75 et pH 5 dans la phase mobile. Dans le cadre de l'étude de quantification par HILIC ESI-MS, un étalon interne d'Eu-DTPA a été utilisé pour la quantification du Gd-DTPA et du Gd-DO3A (annexe 1). Les auteurs n'ont pas en revanche étudié les phénomènes de modification de la répartition des espèces en solution [117]. Dans le cadre de l'étude de la quantification par HILIC ICP-MS, un étalon interne de Pr-DOTA a été employé pour la quantification du Gd-DTPA, du Gd-DTPA-BMA, du Gd-BOPTA, du Gd-DOTA et du Gd-BT-DO3A (annexe 1). Les auteurs n'ont

également pas étudié les phénomènes de modification de la répartition des espèces [120].

La méthode des ajouts dosés n'a pas été testée dans notre étude à cause des mêmes phénomènes probables de modification de la distribution des espèces. Par ailleurs ces phénomènes devront être pris en compte et contrôlés lors des futurs développements de la méthode de quantification par dilution isotopique à pH 3,2.

Pour la suite de nos développements, une quantification par étalonnage externe sans étalon interne des complexes de lanthanides a été envisagée.

### ***3-b) Mode d'acquisition et transitions de fragmentation***

L'ESI-MS disponible au laboratoire a un triple quadripôle comme analyseur et permet d'utiliser la mise en œuvre de divers modes d'acquisition (chapitre I) : le mode fullscan, le mode SIM, le mode SRM et le mode MRM. Le mode fullscan permet de balayer une gamme de masse et de détecter l'ensemble des ions de cette gamme. Le mode « SIM » (*single ion monitoring*) permet de sélectionner un rapport  $m/z$  à détecter. Les modes « SRM » (*single reaction monitoring*) et « MRM » (*multiple reaction monitoring*) permettent de sélectionner un ion précurseur et une (SRM) ou plusieurs (MRM) transition(s) de fragmentation. Ces modes de transitions permettent une mesure spécifique d'un analyte et sont généralement utilisés en quantification afin d'augmenter la fiabilité de la mesure par rapport aux autres modes d'acquisition.

La mise en place des modes « SRM » ou « MRM » nécessite la sélection des transitions de fragmentation des complexes  $[\text{Ln-EDTA}]^-$  et  $[\text{Ln-DTPA+H}]^-$ . À cette fin, les spectres de fragmentation de ces complexes ont été enregistrés en mode MS/MS, en injection directe (annexe 4). L'énergie de fragmentation a été optimisée pour qu'au moins 10 % de l'intensité du rapport  $m/z$  de l'ion précurseur soit conservée (annexe 4) et cette énergie est de 19 eV. De même l'écart de masse  $\Delta m$  autour du rapport  $m/z$  de l'ion précurseur a été optimisé pour conserver le massif isotopique des complexes (annexe 4). Les massifs isotopiques du samarium et du néodyme sont observés pour  $\Delta m = 10$ . La Figure 52 présente les spectres de fragmentation obtenus dans ces conditions.

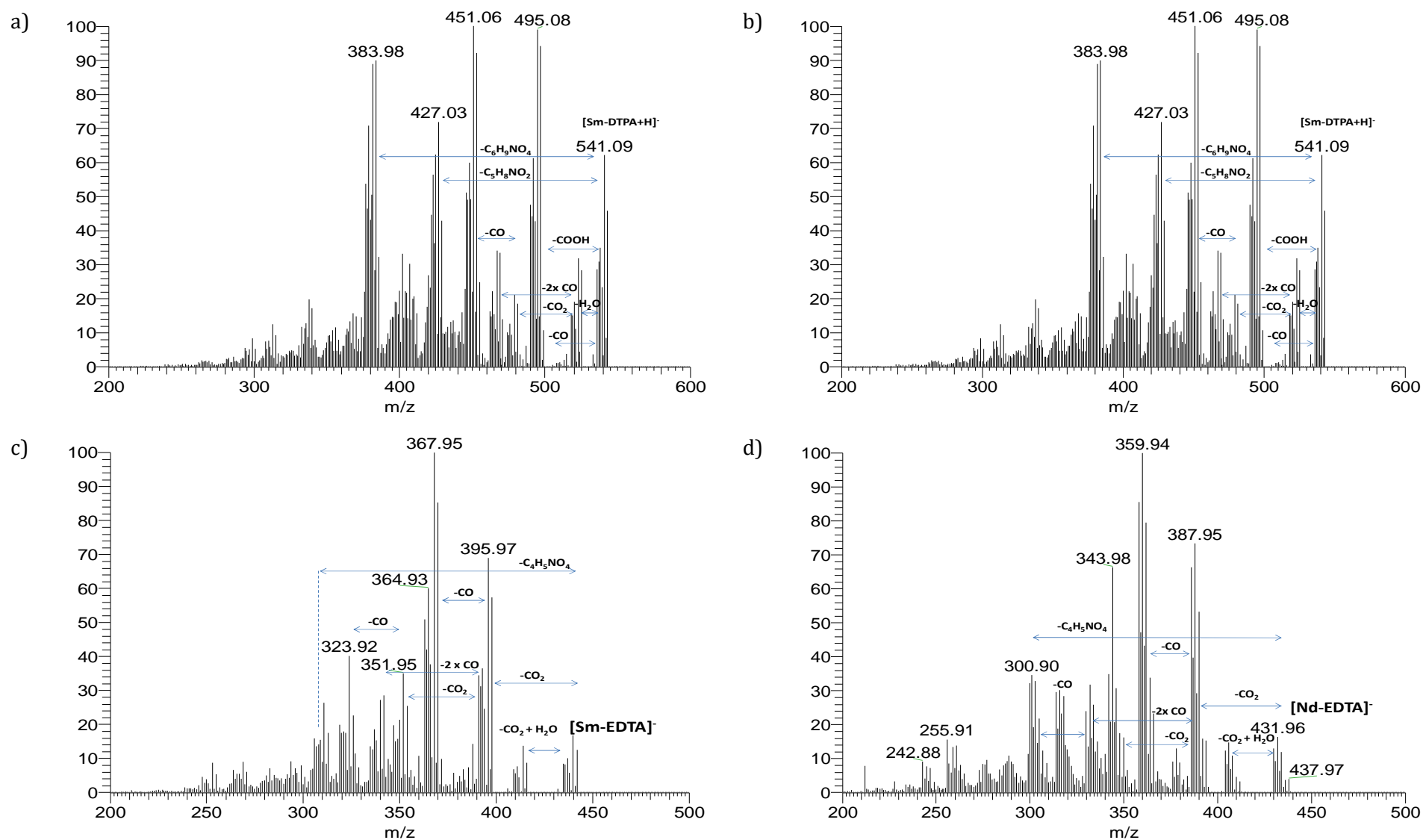


Figure 52 : spectre de fragmentation par ESI-MS, en injection directe avec une énergie de collision de 19 V et un  $\Delta m$  de 10 a) du [Sm-DTPA+H]<sup>+</sup> b) du [Nd-DTPA+H]<sup>+</sup> c) du [Sm-EDTA]<sup>+</sup> d) du [Nd-EDTA]<sup>+</sup>



D'après cette figure, on peut remarquer que :

- bien que les fragments issus des complexes de DTPA et d'EDTA soient similaires ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ...) et caractéristiques des acides carboxyliques, les transitions de fragmentation sont spécifiques de chaque complexe ;

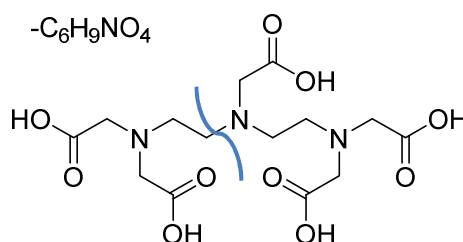
- lors de la fragmentation, les massifs isotopiques du samarium et du néodyme ne sont pas modifiés ;

Pour les complexes d'EDTA, deux fragments majoritaires ont été identifiés : le fragment

$[(\text{Ln-EDTA})-\text{CO}_2]^-$  et le fragment  $[(\text{Ln-EDTA})-\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O}]^-$ . Ce dernier fragment est par ailleurs visible sur les spectres de masse en mode fullscan observés précédemment en HILIC ESI-MS (Figure 46 et Tableau 21).

Pour les complexes de DTPA, trois fragments majoritaires ont été identifiés : le fragment

$[(\text{Ln-DTPA}+\text{H})-\text{CHOOH}]^-$ , le fragment  $[(\text{Ln-DTPA}+\text{H})-\text{CHOOH}-\text{CO}]^-$  et le fragment  $[(\text{Ln-DTPA}+\text{H})-\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_4]^-$  qui correspond à la rupture entre le carbone et l'azote central (Figure 53).



**Figure 53 : fragmentation du DTPA avec perte de  $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}_4$**

Les fragments majoritaires ont été sélectionnés comme transitions de fragmentation pour l'utilisation des modes « SRM » ou « MRM ». Les premiers essais d'analyse en mode « SRM » avec un échantillon contenant du samarium à une concentration de  $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  en présence de DTPA dans les proportions Sm:DTPA 1:1,25 en injection directe ont montré une perte de la sensibilité et une augmentation des limites de détection. Si le mode « SRM » induit généralement un gain en sensibilité par abaissement du bruit de fond, des résultats similaires ont été obtenus dans la littérature concernant une méthode de quantification des agents de contraste à base de gadolinium [117]. Les essais par ESI-MS en injection directe en mode « MRM » avaient également montré une augmentation des limites de détection. Les modes d'acquisition « SRM » et par conséquent « MRM » n'ont pas été sélectionnés. Le mode d'acquisition « SIM » n'a pas été mis en place dans

cette étude puisque ce mode ne permet pas de conserver le motif isotopique des complexes de lanthanides, données d'intérêt en analyse de spéciation.

Pour le développement de la méthode de quantification des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS, le mode d'acquisition « fullscan » a donc été conservé.

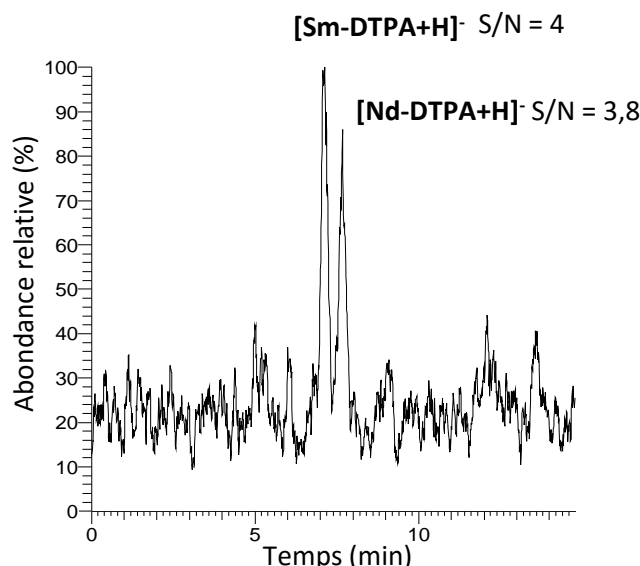
### **3-c) Performances analytiques**

Les performances analytiques de la méthode de quantification des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS ont été déterminées et font l'objet de ce paragraphe. L'ensemble des conditions chromatographiques sont présentées en annexe 4. De même que pour l'échantillon test, les conditions d'ionisation en ESI-MS, à savoir la tension de cône, les débits de gaz et l'optique ionique, ont été optimisées, afin d'obtenir le moins de fragmentation des complexes de lanthanides et l'intensité des ions  $[\text{Ln-DTPA}+\text{H}]^+$  et  $[\text{Ln-EDTA}]^+$  la plus importante. Les paramètres ESI-MS pour ces développements sont identiques à ceux présentés dans le Tableau 38. Le mode d'acquisition est le mode fullscan.

#### **➤ Limites de détection des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS**

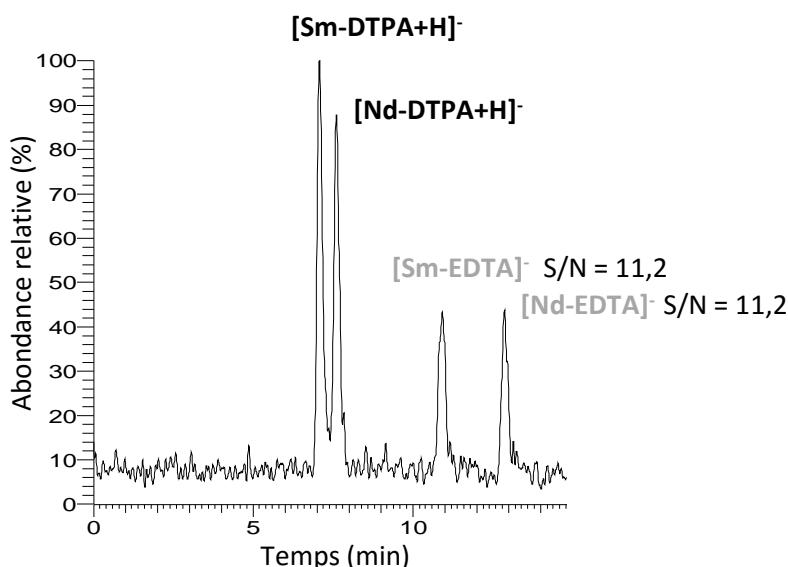
Tout d'abord, les limites de détection (LOD) d'un échantillon de samarium et de néodyme en présence de DTPA et d'EDTA dans les mêmes proportions que l'échantillon test ont été évaluées. Une gamme de concentration de  $2.10^{-9}$  mol.L<sup>-1</sup> à  $1.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total avec  $[\text{Sm}] = [\text{Nd}]$  a été étudiée (annexe 4). Le critère pour la détermination de la limite de détection (LOD) est le suivant : l'intensité du signal doit être trois fois supérieure au bruit de fond (rapport  $S/N = 3$  ;  $S$  = signal ;  $N$  = noise) [170].

Pour les complexes de DTPA, les limites de détection obtenues sont :  $\text{LOD}_{\text{LnT}} = 1,0.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total soit  $\text{LOD}_{\text{Ln-DTPA}} = 5.10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> pour chaque lanthanide (Figure 54).



**Figure 54 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA.**  
Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), 70/30 (v/v) ACN/H<sub>2</sub>O ; [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 15 mmol.L<sup>-1</sup> ; 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. V<sub>inj</sub> = 3  $\mu\text{L}$ ; proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; [Ln<sub>T</sub>] = 1.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> ([Sm] = [Nd])

Concernant les complexes d'EDTA, la LOD est comprise entre 2,0.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total et 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total, soit 1,0.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> < LOD<sub>Ln-EDTA</sub> < 5.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> pour chaque lanthanide. En effet pour 2,0.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total, les complexes ne sont pas détectés et pour une concentration de 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total, le rapport S/N est supérieur à 11 (Figure 55), la LOD se situe donc entre ces deux concentrations.



**Figure 55 : séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA.**  
Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ), 70/30 (v/v) ACN/H<sub>2</sub>O ; [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 15 mmol.L<sup>-1</sup> ; 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.  
V<sub>inj</sub> = 3  $\mu\text{L}$ ; proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; [Ln<sub>T</sub>] = 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> ([Sm] = [Nd])

Ces limites de détection sont supérieures à celles obtenues dans la littérature en HILIC ESI-MS triple quadripôle pour l'analyse des agents de contraste à base de gadolinium où une limite de  $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  a été mesurée pour le Gd-DTPA dans une phase mobile composée de 76/24 (v/v) acétonitrile/eau, 12,5 mmol.L<sup>-1</sup> d'acide formique, 12,5 mmol.L<sup>-1</sup> de formate d'ammonium, pH 3,75 [117]. Les conditions instrumentales et chromatographiques différentes entre cette étude et la nôtre, expliquent probablement ces résultats. Concernant les complexes d'EDTA, aucune étude ne décrit de méthode de quantification de complexes Ln-EDTA par HILIC ESI-MS. Une étude peut toutefois être citée dans laquelle une méthode de quantification du complexe Fe-EDTA par HILIC ESI-MS à haute résolution (LTQ/orbitrap) a été développée [97]. La limite de détection obtenue pour le complexe Fe-EDTA est de  $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$  dans une phase mobile composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 0,1 % (v/v) d'acide formique. Cette limite est mille fois inférieure à celles que nous avons obtenues pour les complexes d'EDTA. Les performances instrumentales différentes entre le LTQ/orbitrap et le QqQ sont probablement à l'origine de ce résultat.

Dans le cadre de l'analyse de spéciation des lanthanides présents dans les phases aqueuses des procédés de traitement du combustible usé, les limites de détection obtenues dans notre étude permettent l'analyse de la majeure partie des lanthanides. En effet, la concentration en gadolinium est de l'ordre de  $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ , celle en néodyme de l'ordre de  $4 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  et celle en samarium de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

#### ➤ **Limites de quantification et domaine de linéarité de la réponse du signal par HILIC ESI-MS**

Afin de déterminer les limites de quantification (LOQ) ainsi que les domaines de linéarité de la réponse du signal en HILIC ESI-MS, une gamme de 9 échantillons de concentration croissante en lanthanide total, de  $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  à  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , a été analysée (annexe 4). La mesure de cette gamme a été répétée 3 fois soit 3 répliques. Les domaines de linéarité ont été déterminés à l'aide de tests statistiques, à savoir par une analyse de la variance (ANOVA) et par le caractère négligeable du terme de second ordre [63]. L'ANOVA permet de valider si un modèle linéaire est en adéquation avec la corrélation entre deux variables. Le caractère négligeable du terme de second ordre permet de déterminer si un modèle quadratique est en adéquation avec les données expérimentales. Les coefficients de régression linéaire  $r^2$  ont également été déterminés. Au-delà des critères statistiques, le domaine de linéarité sélectionné est le plus étendu

possible avec une limite basse du domaine la plus proche de la limite de quantification de l'instrument. Le critère de détermination des limites de quantification (LOQ) est que le rapport S/N soit supérieur à 10 [170]. Ce critère étant obtenu (S/N = 12) pour tous les analytes dont la concentration est supérieure à leur limite de détection, la limite de quantification a été considérée comme étant le niveau de concentration le plus bas du domaine de linéarité.

L'intensité de chaque complexe a été obtenue en intégrant l'aire des pics chromatographique à l'aide du logiciel Xcalibur par extraction des gammes de masse des ions présentés dans le Tableau 21. La répartition expérimentale d'un élément (samarium ou néodyme) a été obtenue à l'aide de l'Équation 7 en considérant les rendements d'ionisation des complexes de DTPA et d'EDTA comme égaux.

$$\%_{Ln-ligand A} = \frac{I_{Ln-Ligand A}}{\sum_i I_{Ln-ligand i}}$$

**Équation 7 : calcul de la proportion d'un complexe d'un élément avec  $I_{Ln-ligand A}$  l'intensité du complexe de lanthanide à ligand A et  $\sum_i I_{Ln-ligand i}$  l'ensemble des complexes d'un même lanthanide, i étant le nombre de ligand.**

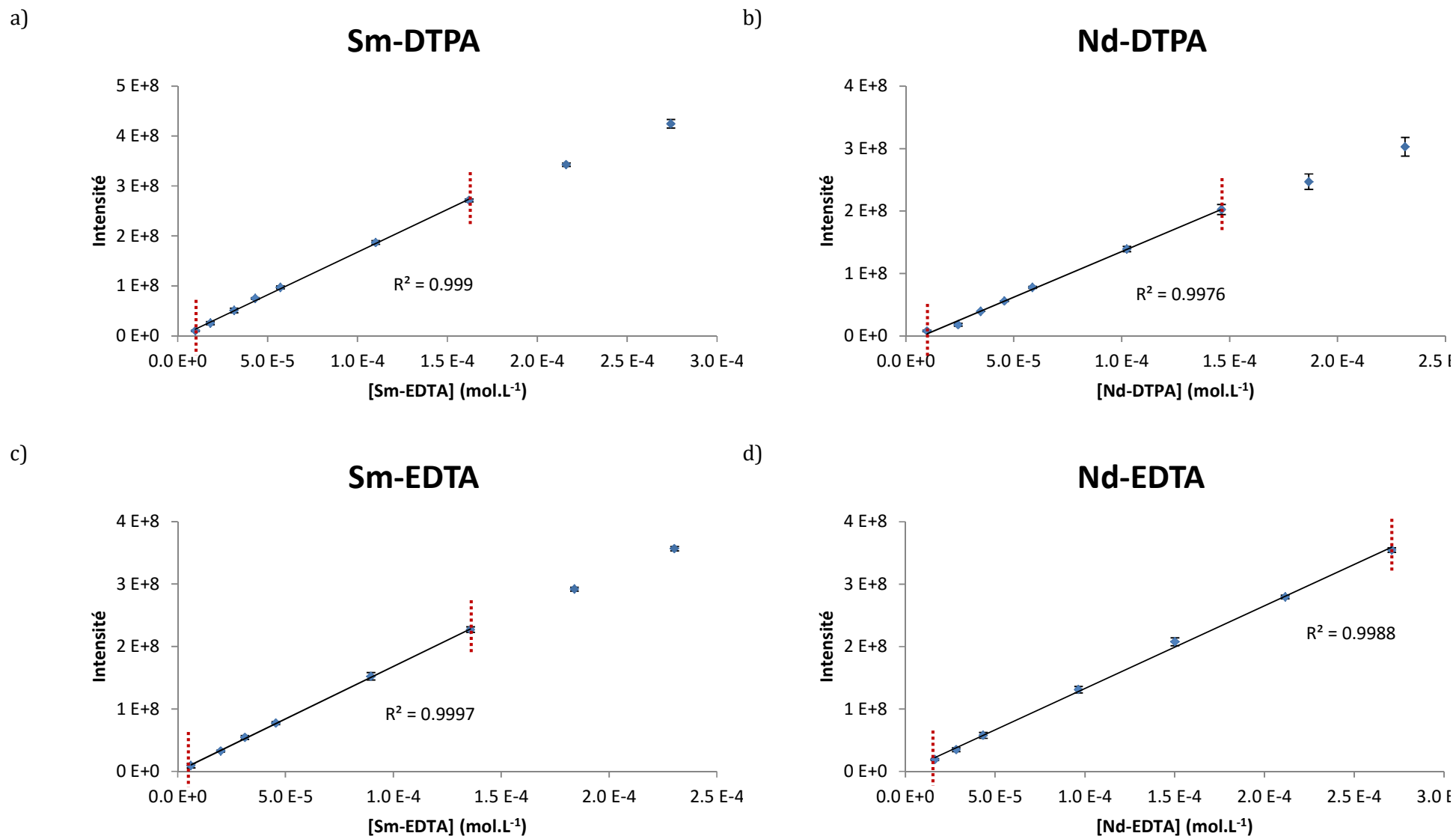
Pour atteindre la concentration d'un complexe dans l'échantillon, la concentration totale d'un lanthanide introduit dans l'échantillon a été multipliée par la proportion de ce complexe déterminée expérimentalement. À titre d'exemple, le calcul de la concentration en Sm-DTPA est décrit par l'Équation 8 :

$$[Sm - DTPA] = [Sm] \times \%_{Sm-DTPA} = [Sm] \frac{I_{Sm-DTPA}}{I_{Sm-DTPA} + I_{Sm-EDTA}}$$

**Équation 8 : calcul de la concentration en Sm-DTPA avec les concentrations en mol.L<sup>-1</sup>**

La proportion observée est de l'ordre de 60% pour les complexes Sm-DTPA et de Nd-DTPA chacun et de 40 % pour les complexes Sm-EDTA et de Nd-EDTA chacun.

La Figure 56 présente les graphiques de la variation de l'intensité des complexes de lanthanide en fonction de la concentration de chaque espèce dans l'échantillon avec les coefficients de régression linéaire associés. L'ensemble des données sont regroupées dans le Tableau 22.



**Figure 56 : variation de l'intensité des complexes de lanthanide séparés par HILIC ESI-MS en fonction de la concentration de chaque espèce : a) Sm-DTPA, b) Nd-DTPA, c) Sm-EDTA d) Nd-EDTA. Les droites noires : droites de régression linéaire. Droites rouges pointillées : limites du domaine de linéarité validées par les tests statistiques**

Complexes	Domaine de linéarité (mol.L <sup>-1</sup> )	LOQ (mol.L <sup>-1</sup> )	Test ANOVA	Test terme quadratique	Coefficient de régression linéaire (r <sup>2</sup> )
Sm-DTPA	9,9.10 <sup>-6</sup> - 1,6.10 <sup>-4</sup>	9,9.10 <sup>-6</sup>	validé	validé	0.9990
Nd-DTPA	9,8.10 <sup>-6</sup> - 1,5.10 <sup>-4</sup>	9,8.10 <sup>-6</sup>	validé	validé	0.9976
Sm-EDTA	6,2.10 <sup>-6</sup> - 1,4.10 <sup>-4</sup>	6,2.10 <sup>-6</sup>	validé	validé	0.9997
Nd-EDTA	1,7.10 <sup>-5</sup> - 2,7.10 <sup>-4</sup>	1,7.10 <sup>-5</sup>	validé	validé	0.9988

**Tableau 22 : Limites de quantification et domaines de linéarité de chaque complexe validés par tests statistiques**

Le domaine de linéarité validé de manière statistique est compris entre 1.10<sup>-5</sup> et 1,5.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> pour les complexes de DTPA, de 6.10<sup>-6</sup> à 1,4.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> pour les complexes [Sm-EDTA] et de 1,7.10<sup>-5</sup> - 2,7.10<sup>-4</sup> pour le complexe [Nd-EDTA].

Comme le montre la Figure 56, les deux derniers niveaux de concentration pour les complexes de DTPA et Sm-EDTA sont en dehors du domaine de linéarité. Ceci indique une évolution non linéaire de l'efficacité d'ionisation le long de la gamme de concentration. Le complexe Sm-EDTA n'est pas détecté dans le premier échantillon 2.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> comme indiqué précédemment. Le domaine de linéarité de ce complexe a été déterminé avec 6 niveaux de concentration. Le complexe Nd-EDTA n'est pas détecté dans les deux échantillons de plus faible concentration, à savoir 2.10<sup>-5</sup> et 5.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total. Le domaine de linéarité a été déterminé sur les 7 niveaux de concentration les plus élevés.

Par ailleurs, les 9 niveaux de concentration pour les complexes de DTPA et Sm-EDTA ont été intégrés dans le calcul de la régression linéaire afin d'évaluer leur impact sur la linéarité du domaine. Les tests statistiques ont été effectués et les coefficients de régression linéaire calculés à nouveau. Les données sont regroupées dans le Tableau 23.

Complexes	Domaine de linéarité (mol.L <sup>-1</sup> )	LOQ (mol.L <sup>-1</sup> )	Test ANOVA	Test terme quadratique	Coefficient de régression linéaire (r <sup>2</sup> )
Sm-DTPA	9,9.10 <sup>-6</sup> -2,7.10 <sup>-4</sup>	9,9.10 <sup>-6</sup>	Non-validé	Non-validé	0.9971
Nd-DTPA	9,8.10 <sup>-6</sup> -2,3.10 <sup>-4</sup>	9,8.10 <sup>-6</sup>	Non-validé	Non-validé	0.9972
Sm-EDTA	6,2.10 <sup>-6</sup> -2,0.10 <sup>-4</sup>	6,2.10 <sup>-6</sup>	Non-validé	Non-validé	0.9977

**Tableau 23 : Limites de quantification et domaines de linéarité de chaque complexe en intégrant l'ensemble des niveaux de concentration**

Même si les tests statistiques ne sont pas validés pour ces domaines, la variation du coefficient de régression est inférieure à 0,2 % suivant le domaine de linéarité considéré.

La détermination de la concentration inconnue d'un échantillon ne devrait donc pas différer selon le domaine de linéarité sélectionné. Suivant les performances analytiques en termes d'incertitude et de justesse à atteindre, les niveaux de concentration pourront être choisis, soit dans le domaine de linéarité validé par tests statistiques soit dans le domaine de linéarité étendu.

### ➤ Stabilité et justesse de la mesure du signal par HILIC ESI-MS

En spectrométrie de masse et notamment en ESI-MS, la réponse du signal à un niveau de concentration peut varier au cours du temps. Afin d'évaluer la stabilité du signal, un échantillon se trouvant au milieu du domaine de linéarité a été injecté 24 fois sur une période de 6 heures. Cet échantillon est composé du samarium et du néodyme en présence d'EDTA et de DTPA dans les proportions lanthanides:EDTA:DTPA 2:0,75:1,75. La concentration de cet échantillon est de  $2.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total. La stabilité de la mesure a été évaluée à l'aide de l'écart-type de la concentration mesurée sur les 24 échantillons, rapporté à la valeur moyenne. La justesse de la mesure a été calculée à l'aide de l'Équation 9 :

$$justesse = \frac{C_{ét} - C_{éch}}{C_{éch}}$$

**Équation 9 : calcul de la justesse avec  $C_{ét}$ , la concentration obtenue avec la droite d'étalonnage et  $C_{éch}$ , la concentration dans l'échantillon**

Les données de stabilité et de justesse de la mesure par HILIC ESI-MS sont présentées dans le Tableau 24.

Complexes	Domaine de linéarité statistique		Domaine de linéarité étendu	
	Stabilité (écart-type) (%)	Justesse (%)	Stabilité (écart-type) (%)	Justesse (%)
Sm-DTPA	2.63	2.88	2.82	4.43
Nd-DTPA	2.95	3.94	3.12	5.31
Sm-EDTA	4.08	1.41	4.38	2.00
Nd-EDTA	3.52	-0.01	3.52	-0.01

**Tableau 24 : données expérimentales de stabilité et de justesse de la mesure par HILIC ESI-MS (n = 24)**

D'après les données du Tableau 24, les écarts-types sont de l'ordre de 3-4 % pour les deux domaines de concentration. Ces résultats démontrent que la réponse du signal des complexes de lanthanides obtenue par HILIC ESI-MS est stable au cours de temps. Ainsi l'ajout d'un étalon interne pour corriger la dérive instrumentale ne semble pas dans un premier temps nécessaire. L'étalonnage externe sans étalon interne semble donc être une méthode de quantification adéquate pour les complexes de lanthanides. Concernant la justesse, les variations expérimentales sont inférieures à 4% avec le domaine de



linéarité validé par tests statistiques et inférieures à 6 % pour le domaine de linéarité étendu. Ainsi quel que soit le domaine de linéarité sélectionné, les performances analytiques de la méthode de quantification sont du même ordre de grandeur.

*Une première méthode de quantification des complexes de samarium et de néodyme à ligands DTPA et EDTA a été mise au point par HILIC ESI-MS. Aucun des différents essais d'étalons internes de complexes Tb-DTPA, Tm-DTPA, Tb-EDTA et Tm-EDTA n'a abouti à cause de la modification de la distribution des espèces de lanthanides lors de l'addition d'un étalon interne. En conséquence, une approche de quantification par étalonnage externe sans étalon interne a été sélectionnée. Le mode d'acquisition « fullscan » a été conservé puisque le mode « SRM » et par conséquent le mode « MRM » n'ont pas pu être mis en place pour la quantification des complexes de lanthanides à cause d'une baisse de sensibilité de la mesure trop importante.*

*Les limites de quantification des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS en mode fullscan ont été évaluées et sont de l'ordre de  $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> pour les complexes de DTPA, de  $6,2.10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> pour le complexe Sm-EDTA et de  $1,7.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> pour le complexe Nd-EDTA. Les domaines de linéarité de la réponse en ESI-MS ont été déterminés par tests statistiques (ANOVA, prédominance du terme quadratique) pour l'ensemble des complexes de DTPA et d'EDTA et s'étendent sur 1,5 ordre de grandeur de concentration, de  $2.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> à  $1,5.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> environ, pour chaque lanthanide. Des domaines de linéarité étendus, de  $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> à  $2,5.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> environ, pour lequel une variation de justesse inférieure à 2 % a été obtenue ont également été déterminés pour chaque lanthanide. La stabilité et la justesse de la mesure par HILIC ESI-MS ont également été évaluées. La variation de la mesure au cours du temps et la justesse de la mesure sont toutes deux inférieures à 5 %.*

*Ainsi la méthode de séparation des complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA par HILIC ESI-MS permet non seulement d'obtenir des données de spéciation comme la caractérisation structurale des complexes et mais aussi leur quantification.*

#### **4 Potentiel d'utilisation de l'ESI-MS pour des études de caractérisation isotopique**

La détermination de la répartition des isotopes d'un élément est une information importante dans le domaine de l'analyse de spéciation. De plus, la composition isotopique est requise pour la caractérisation des éléments présents dans les phases aqueuses des procédés de traitement du combustible usé, puisque ces éléments

radioactifs ne présentent pas des abondances isotopiques naturelles. Par ailleurs, la mesure de l'isotopie d'un élément permet d'envisager le développement de méthode de quantification par dilution isotopique. Ces analyses de compositions isotopiques sont généralement effectuées par TIMS ou ICP-MS. Une étude récente décrit le développement d'une méthode de séparation par IC ICP-MS-MC pour la mesure des rapports isotopiques de néodyme dans le domaine du nucléaire [60]. Il n'existe que très peu d'études relatives à l'utilisation de l'ESI-MS pour effectuer des mesures isotopiques [171-173]. Dans ces études, la mesure de la composition isotopique est effectuée, soit sur l'élément seul, soit sur un élément lié à des atomes monoisotopiques (atomes de fluor) ou ne modifiant que peu le rapport isotopique à mesurer (atomes d'oxygène). Dans tous les cas, la mesure isotopique est effectuée par injection directe et aucune étude ne décrit l'utilisation d'un couplage avec la chromatographie pour la caractérisation des isotopes d'éléments contenus dans des complexes.

Le potentiel de l'utilisation de l'ESI-MS pour la mesure isotopique d'un élément a donc été évalué par la caractérisation isotopique du complexe Sm-DTPA et plus particulièrement de l'ion majoritaire  $[\text{Sm-DTPA}+\text{H}]^-$  afin de déterminer les performances instrumentales de l'ESI-MS pour ce type d'analyse, par injection directe ou après une séparation chromatographique. Les paramètres ESI-MS en injection directe ont été optimisés et sont présentés dans le tableau suivant. Quant à ceux utilisés en HILIC ESI-MS, les paramètres sont ceux du Tableau 38.

Paramètres ESI-MS	Valeurs
Mode d'acquisition	fullscan
Tension de spray	- 3 kV
Gaz séchant	10 ua
Gaz auxiliaire	5 ua
Température de vaporisation	50°C
Température du capillaire de transfert	250°C

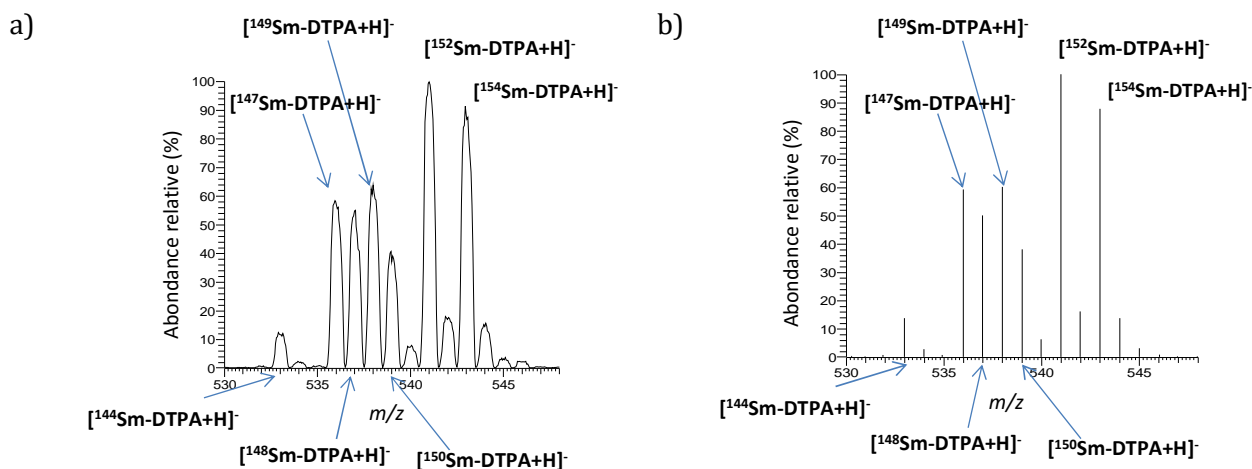
**Tableau 25: paramètres instrumentaux de l'ESI-MS en injection directe**

Les spectres de masse obtenus ont été comparés aux spectres de masse théoriques calculés par le logiciel d'exploitation et aux données de la littérature [168].

Différentes conditions d'acquisition du signal ont été testées par injection directe et en couplage HILIC ESI-MS afin de déterminer les paramètres significatifs influençant la mesure de la composition isotopique :

- acquisition du spectre de masse en mode profil (P) ou en mode centroïde (C) : un spectre de masse peut être obtenu, soit en mode profil où le spectre brut du signal du détecteur est présenté, soit en mode centroïde (bâtonnets) où le spectre de masse est

traité par le logiciel pour obtenir le barycentre de chaque masse constituant le profil isotopique. Les spectres théoriques en mode profil et en mode centroïde du  $[\text{Sm-DTPA+H}]^-$  sont présentés en Figure 57 ;



**Figure 57 : spectre de masse théorique du  $[\text{Sm-DTPA+H}]^-$  a) en mode profil b) en mode centroïde**

- acquisition du spectre de masse à différentes fréquences : la fréquence de balayage d'une gamme de masse correspond à la fréquence d'acquisition de l'analyseur de la gamme de masse sélectionnée. La fréquence de balayage permet d'acquérir plus ou moins d'ions au niveau du détecteur et ainsi de modifier la définition des spectres de masse. Les fréquences de balayage sélectionnées sont de  $0,5 \text{ s.scan}^{-1}$  (F) ou de  $0,25 \text{ s.scan}^{-1}$  (DF).

Un échantillon contenant du samarium à une concentration de  $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  en présence de DTPA dans les proportions Sm:DTPA 1:1,25 a été analysé dix fois pendant une minute en injection directe et dix fois par HILIC ESI-MS dans les mêmes conditions de séparation étudiées dans le chapitre III (annexe 4). Pour chaque mode d'acquisition et pour différentes fréquences de balayage, les rapports isotopiques  $\frac{I_{A\text{Sm-DTPA}}}{I_{150\text{Sm-DTPA}}}$  sont déterminés, avec A, le numéro atomique des isotopes considérés du samarium, à savoir  $^{147}\text{Sm}$ ,  $^{148}\text{Sm}$ ,  $^{149}\text{Sm}$ ,  $^{152}\text{Sm}$ ,  $^{154}\text{Sm}$ . La valeur moyenne de ces rapports d'intensité a été calculée à partir des dix mesures effectuées. Les rapports d'abondances théoriques obtenus à l'aide du logiciel prennent en compte la répartition des isotopes des atomes du DTPA et d'un isotope du samarium. L'ensemble de ces données est présenté dans le Tableau 26. Les valeurs des rapports isotopiques naturels proposées par l'IUPAC [168] sont également reportées dans ce tableau.

	Conditions d'acquisition	$^{144}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{147}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{148}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{149}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{152}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{154}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$
Moyenne des rapports expérimentaux obtenus par injection directe	F P	0,315	1,461	1,356	1,581	2,587	2,234
	F C	0,311	1,486	1,365	1,585	2,606	2,291
	DF P	0,317	1,482	1,360	1,590	2,604	2,247
	DF C	0,311	1,476	1,366	1,588	2,625	2,294
Moyenne des rapports expérimentaux obtenus par HILIC ESI-MS	F P	0,318	1,473	1,383	1,611	2,618	2,274
	F C	0,305	1,510	1,363	1,594	2,655	2,320
	DF P	0,331	1,493	1,350	1,585	2,567	2,230
	DF C	0,286	1,473	1,356	1,612	2,671	2,359
Rapports théoriques		0,303	1,478	1,356	1,598	2,667	2,336
		$^{144}\text{Sm}/^{150}\text{Sm}$	$^{147}\text{Sm}/^{150}\text{Sm}$	$^{148}\text{Sm}/^{150}\text{Sm}$	$^{149}\text{Sm}/^{150}\text{Sm}$	$^{152}\text{Sm}/^{150}\text{Sm}$	$^{154}\text{Sm}/^{150}\text{Sm}$
Rapports isotopiques naturels du samarium issus de l'IUPAC [168]		0,416	2,032	1,523	1,872	3,624	3,083

**Tableau 26 : moyenne des rapports des intensités du complexe Sm-DTPA contenant un isotope particulier du samarium sur celle du complexe  $^{150}\text{Sm-DTPA}$  obtenue par injection directe et par HILIC ESI-MS ainsi que les rapports théoriques calculés par le logiciel d'exploitation des spectres de masse et les rapports élémentaires issus de l'IUPAC [168] F : 0,5 s.scan<sup>-1</sup>. DF : 0,25 s.scan<sup>-1</sup>. P : mode profil, C : mode centroïde**

La répétabilité de la mesure a été évaluée avec l'écart-type de la mesure de chaque rapport pour les dix échantillons. La justesse a été obtenue en comparant la moyenne des rapports des intensités mesurées aux rapports de celles des spectres théoriques. L'ensemble des données est présenté dans le Tableau 27.

Les données du Tableau 26 montrent que les valeurs des rapports élémentaires proposés par l'IUPAC sont différentes de celles des rapports théoriques calculés par le logiciel d'exploitation. Ceci est dû à la prise en compte de l'isotopie des atomes de DTPA dans la valeur des rapports calculée par le logiciel. Malheureusement, les algorithmes de calculs des spectres de masse utilisés par le logiciel d'exploitation sont confidentiels et aucune information n'a pu être obtenue auprès du constructeur. Par conséquent, nous n'avons pas pu recalculer les rapports isotopiques du samarium sous forme élémentaire à partir des rapports isotopiques mesurés sous forme du complexe  $[\text{Sm-DTPA+H}]^-$ . Ainsi la comparaison avec les données concernant les rapports isotopiques du samarium naturel proposés par l'IUPAC n'a pas pu être réalisée à ce stade. En revanche, des études décrivent des méthodes et des algorithmes permettant de déterminer la contribution isotopique de chaque élément sur un rapport  $m/z$  grâce à la formule chimique de l'espèce d'intérêt [174-176]. L'application de ces méthodes de calculs à nos résultats est en cours de réalisation.

	Conditions d'acquisition	Données	$^{144}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{147}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{148}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{149}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{152}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$	$^{154}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$
Injection directe	F P	Répétabilité (écart-type) (%)	4,4%	3,4%	3,3%	2,2%	3,0%	3,5%
		Justesse (%)	4,0%	-1,1%	-0,1%	-1,0%	-3,0%	-4,2%
	F C	Répétabilité (écart-type) (%)	1,7%	1,5%	1,7%	1,2%	1,6%	1,7%
		Justesse (%)	2,9%	0,5%	0,7%	-0,8%	-2,3%	-1,7%
	DF P	Répétabilité (écart-type) (%)	4,1%	2,5%	2,7%	1,9%	2,1%	2,8%
		Justesse (%)	4,8%	0,3%	0,3%	-0,5%	-2,4%	-3,6%
	DF C	Répétabilité (écart-type) (%)	2,6%	3,4%	2,7%	1,0%	1,6%	1,0%
		Justesse (%)	2,8%	-0,1%	0,7%	-0,7%	-1,6%	-1,6%
HILIC ESI-MS	F P	Répétabilité (écart-type) (%)	7,5%	6,5%	5,7%	6,8%	7,8%	6,0%
		Justesse (%)	5,2%	-0,3%	1,9%	0,8%	-1,8%	-2,5%
	F C	Répétabilité (écart-type) (%)	6,5%	5,0%	4,3%	4,9%	4,7%	5,0%
		Justesse (%)	0,8%	2,2%	0,6%	-0,3%	-0,4%	-0,5%
	DF P	Répétabilité (écart-type) (%)	9,1%	6,2%	6,0%	5,5%	4,7%	4,6%
		Justesse (%)	9,3%	1,0%	-0,5%	-0,8%	-3,7%	-4,4%
	DF C	Répétabilité (écart-type) (%)	6,1%	5,1%	5,0%	4,2%	4,0%	4,5%
		Justesse (%)	-5,3%	-0,4%	0%	0,8%	0,2%	1,2%

**Tableau 27 : répétabilité et justesse de la mesure isotopique du complexe [Sm-DTPA+H]<sup>+</sup> par injection directe et par HILIC ESI-MS.  
F : 0,5 s.scan<sup>-1</sup>. DF : 0,25 s.scan<sup>-1</sup>. P : mode profil, C : mode centroïde**

D'après le Tableau 27, on peut observer qu'en injection directe :

- quelles que soient les conditions d'analyse, la répétabilité de la mesure est inférieure à 5 % ;

- la justesse de la mesure est de l'ordre de 2 % en mode centroïde et inférieure à 5 % en mode profil.

Les données du Tableau 27 indiquent également que par HILIC ESI-MS :

- la répétabilité de la mesure est toujours inférieure à 10 % quelles que soient les conditions d'analyse. Des justesses de mesure de l'ordre de 2 % sont obtenues par comparaison avec les rapports théoriques, à l'exception du rapport des intensités correspondant à  $^{144}\text{Sm-DTPA}/^{150}\text{Sm-DTPA}$  où la justesse est comprise entre 5 et 10 %. Ceci s'explique par la faible abondance du  $^{144}\text{Sm}$  ; la contribution du bruit de fond à la mesure de l'intensité de ce rapport  $m/z$  est ainsi plus importante ;

- les mesures effectuées en mode centroïde sont plus répétables qu'en mode profil avec une répétabilité de l'ordre de 5 %. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'intensité maximale du pic centroïde est obtenue à partir de l'ensemble des points composant l'enveloppe du pic, tandis l'intensité maximale en mode profil est obtenue avec une seule valeur d'intensité. La mesure de cette dernière induit donc plus de variabilité ;

- concernant la justesse, celle-ci est sensiblement meilleure en mode centroïde qu'en mode profil pour les mêmes raisons que pour la répétabilité ;

En ce qui concerne les deux fréquences d'acquisition, aucune tendance n'est observée en injection directe et en HILIC ESI-MS. En revanche, la taille des fichiers d'acquisition est deux fois plus importante avec la fréquence de 0,25 s.scan<sup>-1</sup>. Les fichiers en LC ESI-MS étant déjà très volumineux, une fréquence de 0,5 s.scan<sup>-1</sup> est préférable.

Que ce soit en injection directe ou en couplage HILIC ESI-MS, le mode d'acquisition centroïde avec une fréquence de 0,5 s.scan<sup>-1</sup> présente un bon compromis pour l'obtention d'analyses répétables et justes avec des fichiers d'acquisition moins volumineux. Par ailleurs, les performances analytiques en terme de justesse et de répétabilité pour la caractérisation isotopique d'une espèce sont meilleures par injection directe que par HILIC ESI-MS. Cela est notamment dû au fait que les données par HILIC ESI-MS sont obtenues à partir d'un signal transitoire, tandis qu'en injection directe les données sont mesurées sur un signal continu ; les signaux n'ont ainsi pas la même forme.

Comme indiqué précédemment, il est difficile de comparer ces données avec la littérature puisque la mesure isotopique par couplage LC ESI-MS de complexes de

lanthanide n'a jamais été décrite. Il s'agit donc des premières données en LC ESI-MS. Toutefois, la mesure des rapports isotopiques des isotopes du néodyme pour les applications nucléaires a été réalisée par IC-HPLC ICP-MS-MC [60]. Des répétabilités de l'ordre de 0,2 % ont été obtenues après la séparation. Concernant l'injection directe en ESI-MS, les rapports isotopiques d'éléments comme l'uranium, l'argent, le thallium ou le bore ont été mesurés [171-173]. Les mesures ayant été directement réalisées sur les isotopes des éléments d'intérêt, les auteurs ont pu comparer leurs résultats avec les abondances élémentaires naturelles. Des justesses allant de 1,8 % à 0,4 ‰ ont été obtenues [171-173], ce qui est en accord avec les gammes de justesse que nous avons relevées.

*Le potentiel de l'utilisation de l'ESI-MS pour effectuer des mesures isotopiques en injection directe et par HILIC ESI-MS a été évalué avec le complexe [Sm-DTPA+H]<sup>+</sup>. La répétabilité de la mesure des rapports isotopiques des isotopes du samarium en tenant compte des isotopes du ligand DTPA a été déterminée, de même que la justesse, en utilisant les spectres théoriques simulés par le logiciel. Elles sont respectivement inférieures à 5 % et de l'ordre de 2 % en injection directe et inférieures à 10 % et de l'ordre de 2 % par HILIC ESI-MS. Les rapports isotopiques du samarium élémentaire déterminés à partir des rapports isotopiques du complexe [Sm-DTPA+H]<sup>+</sup> n'ont pas pu être recalculés en raison de la confidentialité des algorithmes du logiciel d'exploitation des spectres de masse. Cependant, des méthodes de déconvolution de ces spectres de masse sont décrites dans la littérature et l'application de ces méthodes est en cours de réalisation.*

## **5 Conclusion**

Une méthode de quantification a été développée par HILIC ESI-MS dans le but de séparer, caractériser et quantifier des complexes de lanthanides d'intérêt pour l'aval du cycle du combustible nucléaire usé. Les complexes de samarium et de néodyme à ligands DTPA et EDTA ont été étudiés. Une méthode de quantification par étalonnage externe sans étalon interne a été développée à cause de la modification de la répartition des espèces dans nos conditions expérimentales, lors de l'ajout des étalons internes envisagés, comme le Tb-EDTA, le Tb-DTPA, le Tm-DTPA et le Tm-EDTA. La méthode des ajouts dosés n'a pas été envisagée également à cause de cette modification de la répartition des espèces. Le mode d'acquisition « *fullscan* » a été conservé à cause d'une diminution de la sensibilité en mode « SRM ». Ces résultats confirment que l'aspect quantitatif de l'analyse de spéciation par HILIC ESI-MS est soumis à des contraintes. Les



méthodes classiques en ESI-MS d'amélioration des performances de la méthode de quantification en termes notamment de spécificité et de répétabilité, comme le mode « MRM » ou l'ajout d'étalon interne, ne sont pas applicables. Toutefois, la stabilité du signal obtenue lors des 24 injections montre que la dérive du signal est faible.

Les limites de quantification des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS en mode *fullscan* ont été évaluées et sont de l'ordre  $1.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> pour les complexes de DTPA, de  $6,2.10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> pour le complexe Sm-EDTA et  $1,7.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> pour le complexe Nd-EDTA. Le domaine de linéarité de la réponse du signal en ESI-MS a été validé par tests statistiques pour l'ensemble des complexes. Ce domaine s'étend sur environ un 1,5 ordre de grandeur de  $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. La stabilité et la justesse de la mesure ont été déterminées et sont inférieures à 5 %. Ces résultats montrent que, bien que le domaine de linéarité du signal en ESI-MS soit relativement restreint comparé à ceux obtenus pour l'analyse de molécules organiques, la méthode de quantification développée au cours de cette étude permet d'atteindre des performances analytiques acceptables.

Le potentiel de l'utilisation de l'ESI-MS pour la mesure isotopique de composés d'intérêt contenus dans les phases aqueuses des procédés de traitement du combustible usé et pour la mise en œuvre future d'approches de quantification par dilution isotopique a été évalué avec le complexe [Sm-DTPA+H]<sup>-</sup> en injection directe et par HILIC ESI-MS. À notre connaissance, concernant la caractérisation isotopique des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS, ces données préliminaires sont les premières à être obtenues. Les rapports isotopiques du samarium à partir des rapports isotopiques du complexe [Sm-DTPA+H]<sup>-</sup> n'ont pas pu être déterminés en raison de la confidentialité des algorithmes du logiciel d'exploitation des spectres de masse. Cependant, des méthodes de déconvolution de ces spectres de masse sont décrites dans la littérature et l'application de ces méthodes est en cours de réalisation.

Afin de pouvoir déterminer la spéciation des lanthanides en une seule analyse, le couplage de la chromatographie en mode HILIC avec les spectrométries de masse ICP-MS et ESI-MS a été mis en œuvre et fait l'objet du prochain chapitre. Ce couplage permet d'obtenir des informations exhaustives, à savoir la caractérisation structurale, élémentaire et isotopique des espèces en solution de manière simultanée. Le développement d'une méthode de quantification simultanée par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS sera aussi présenté. Cette méthode de quantification par HILIC ICP-MS permettra également de valider les données obtenues par HILIC ESI-MS.

## **Chapitre V**

### **Vers l'analyse de spéciation exhaustive : mise au point du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC avec l'ESI- MS et l'ICP-MS**

Dans l'objectif de caractériser et de quantifier en une seule analyse l'ensemble des espèces de lanthanides présentes dans un échantillon, une méthode d'analyse de spéciation par chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) couplée simultanément à la spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS) a été développée. Ce chapitre présente les développements méthodologiques et instrumentaux réalisés pour la mise en place de cette méthode. La première partie est consacrée à la mise au point d'un diviseur de flux permettant de scinder la phase mobile vers les deux types de spectromètre de masse tout en tenant compte des contraintes spécifiques de chaque instrument. Si les phases mobiles de l'HILIC sont compatibles avec les conditions d'ionisation en ESI-MS, l'introduction de solvant organique dans l'ICP-MS nécessite un certain nombre de précautions. L'ensemble des paramètres instrumentaux associés seront donc également présentés. La deuxième partie décrit le développement d'une méthode de quantification simultanée par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS. Les performances analytiques y sont présentées, en particulier la linéarité ainsi que la justesse de la mesure des analytes avec chaque instrument. La distribution des espèces de lanthanides dans les échantillons a alors été calculée à partir des données obtenues avec chaque spectromètre de masse et fait l'objet de la troisième partie.

## **1 Faisabilité du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC avec l'ESI-MS et l'ICP-MS**

Pour la mise en place du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC avec l'ESI-MS et l'ICP-MS, le système d'étude est identique à celui utilisé dans le chapitre IV, à savoir du samarium et du néodyme en présence de DTPA et d'EDTA. Les concentrations en samarium et en néodyme sont chacune de  $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>, soit respectivement 17,4 ppm et 16,7 ppm. Les proportions lanthanides:EDTA:DTPA sont de 2:1,75:0,75. Cela constitue l'échantillon test. La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau ; 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium ; 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de 300  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> ( $D_{\text{sép}}$ ).

### ***1-a) Dimensionnement d'un système de couplage spécifique***

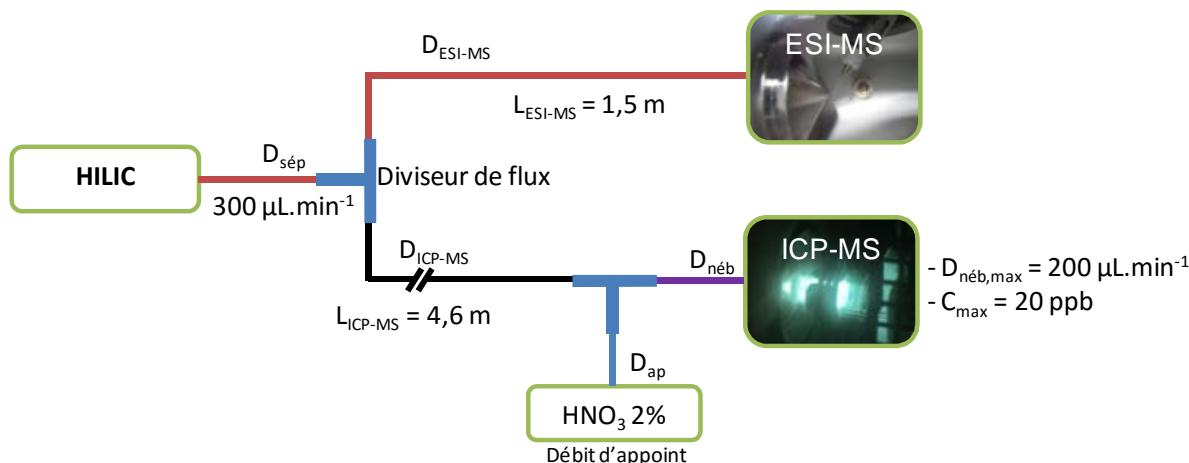
Différents types de diviseurs de flux existent : les micromixers à rapport de partage fixé ou variable et les connectiques en T sans volume mort dont le rapport de partage dépend des tubulures en aval de la connectique en T. Dans notre étude, nous avons

choisi d'utiliser un diviseur de flux avec une connectique en T sans volume mort (annexe 4), afin de pouvoir s'adapter aux contraintes instrumentales de chaque spectromètre de masse. Ces contraintes vont imposer le rapport de partage de la phase mobile vers l'ESI-MS et l'ICP-MS. Concernant l'ESI-MS, l'étude menée au chapitre IV a montré que celui-ci peut supporter jusqu'à 100 % du débit de la phase mobile. Les contraintes pour le partage de flux sont essentiellement imposées par l'ICP-MS. Par ailleurs, les longueurs des tubulures dépendent des distances entre les instruments du laboratoire installés en zone contrôlée pour les futures analyses d'échantillons radioactifs. Ainsi le dimensionnement du diviseur de flux doit tenir compte des contraintes suivantes :

- les longueurs des tubulures vers l'ICP-MS et l'ESI-MS qui sont :  $L_{\text{ICP-MS}} = 4,6 \text{ m}$  et  $L_{\text{ESI-MS}} = 1,5 \text{ m}$  ;
- le débit de nébulisation du nébuliseur ( $D_{\text{néb,max}}$ ) qui est fixé à  $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pour ces premiers essais ;
- la concentration de l'analyte introduite dans l'ICP-MS qui ne doit pas dépasser 20 ppb. Cette concentration permet de rester dans le mode impulsion du détecteur de l'ICP-MS (chapitre I), lors de l'analyse de signaux transitoires. Cela permet de garantir les performances analytiques, à savoir la répétabilité et la justesse de la mesure, les meilleures possible lors de la mise en place de méthode de quantification.

Cette dernière contrainte implique l'introduction d'un débit d'appoint d'acide nitrique 2% dans le flux allant vers l'ICP-MS. En plus de diluer les analytes en solution pour ne pas saturer la détection par ICP-MS, ce débit d'appoint ( $D_{\text{ap}}$ ) a deux autres rôles : diminuer la charge en solvant organique introduite dans la source de l'ICP-MS afin d'améliorer la stabilité et la sensibilité de la mesure du signal et adapter le débit du nébuliseur de l'ICP-MS. Le mélange des deux flux est effectué à l'aide d'une chambre de mélange de faible volume (annexe 4) pour diminuer les effets de dispersion. Par ailleurs, dans le cadre de futurs développements de méthode de quantification par dilution isotopique, ce débit d'appoint pourra permettre l'introduction de traceurs post-colonne pour une approche par dilution isotopique non spécifique (chapitre IV).

Le schéma de principe du couplage simultanée entre la chromatographie en mode HILIC, l'ESI-MS et l'ICP-MS, récapitulant les contraintes instrumentales est présenté dans la Figure 58 :



**Figure 58 : schéma de principe du couplage simultané entre la chromatographie en mode HILIC, l'ESI-MS et l'ICP-MS, avec les différents débits dans chaque partie du montage**

Les paramètres restant à déterminer pour le dimensionnement du couplage sont les suivants :

- les diamètres des tubulures amenant la phase mobile vers l'ESI-MS et l'ICP-MS ;
- la valeur du débit d'appoint ( $D_{ap}$ ) ;
- le rapport de partage ( $R$ ) des débits de l'ESI-MS ( $D_{ESI-MS}$ ) et de l'ICP-MS ( $D_{ICP-MS}$ ).

Concernant le rapport de partage  $R$ , celui-ci peut être déterminé de manière théorique : au niveau du diviseur de flux, la perte de charge linéaire dans la partie ICP-MS ( $\Delta p_{ICP-MS}$ ) est égale à la perte de charge linéaire au niveau de l'ESI-MS ( $\Delta p_{ESI-MS}$ ), d'où l'égalité suivante (Équation 10) :

$$\Delta p_{ESI-MS} = \Delta p_{ICP-MS} \text{ avec } \Delta p = \frac{\Lambda \rho \cdot u^2}{d} L$$

**Équation 10 : égalité des pertes de charges de chaque partie au niveau du diviseur de flux avec  $\Delta p$  (Pa) la perte de charge linéaire dans une tubulure ;  $\Lambda$  le coefficient de perte de charge ;  $d$  le diamètre du tube,  $\rho$  la masse volumique du fluide ( $\text{kg.m}^{-3}$ ),  $u$  la vitesse linéaire ( $\text{m.s}^{-1}$ ) et  $L$  la longueur du tube (m)**

Sachant que le coefficient de perte de charge est relié au nombre de Reynolds (Équation 11),

$$\Lambda = \frac{64}{Re} \text{ avec } Re = \frac{\rho \cdot u \cdot d}{\eta}$$

**Équation 11 : relation entre le coefficient de perte de charge  $\Lambda$  et le nombre de Reynolds  $Re$  avec  $\rho$  la masse volumique de la phase mobile,  $\eta$  viscosité dynamique de la phase mobile (Pa.s),  $u$  la vitesse linéaire (m.s<sup>-1</sup>) et  $d$  le diamètre du tube (m)**

l'Équation 10 en régime laminaire devient l'Équation 12 :

$$\frac{32\eta \cdot u_{ESI-MS} \cdot L_{ESI-MS}}{d_{ESI-MS}^2} = \frac{32\eta \cdot u_{ICP-MS} \cdot L_{ICP-MS}}{d_{ICP-MS}^2}$$

**Équation 12 : relation en la perte de charge  $\Delta p$ ,  $\eta$  viscosité dynamique de la phase mobile (Pa.s),  $u$  la vitesse linéaire (m.s<sup>-1</sup>),  $d$  le diamètre du tube (m) et  $L$  la longueur du tube (m)**

Sachant que la vitesse linéaire dans la tubulure est reliée au débit volumique de la phase mobile (Équation 13),

$$D = uS = u \cdot \pi \cdot \frac{d^2}{4}$$

**Équation 13 : relation entre le débit volumique  $D$  (m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>) et la vitesse linéaire  $u$  (m.s<sup>-1</sup>) avec  $S$  la section du tube (m<sup>2</sup>) et  $d$  le diamètre du tube**

l'Équation 12 devient l'Équation 14 après simplification :

$$\frac{D_{ESI-MS} \cdot L_{ESI-MS}}{d_{ESI-MS}^4} = \frac{D_{ICP-MS} \cdot L_{ICP-MS}}{d_{ICP-MS}^4} \text{ ou } D_{ESI-MS} = R D_{ICP-MS} \text{ en posant } R = \frac{d_{ESI-MS}^4}{d_{ICP-MS}^4} \times \frac{L_{ICP-MS}}{L_{ESI-MS}}$$

**Équation 14 : relation entre débit de l'ICP-MS et celui de l'ESI-MS, ainsi que la longueur et le diamètre des tubulures et  $R$  le rapport de partage**

Ainsi, une relation entre le rapport de partage  $R$ , les diamètres et les longueurs des tubulures a été déterminée. Par ailleurs, la fraction de phase mobile allant vers l'ESI-MS ( $\frac{D_{ESI-MS}}{D_{\text{sep}}}$ ) est égale à  $\frac{R}{R+1}$  et celle vers l'ICP-MS ( $\frac{D_{ICP-MS}}{D_{\text{sep}}}$ ) à  $\frac{1}{R+1}$ . Par conséquent, dans notre étude, seuls les diamètres des tubulures de l'ESI-MS et de l'ICP-MS sont à déterminer pour le dimensionnement du rapport de partage.

Afin de pouvoir sélectionner le couple de diamètres adéquats imposant le débit de l'ESI-MS et de l'ICP-MS, il est nécessaire de connaître tout d'abord le débit d'appoint et plus précisément le facteur de dilution nécessaire pour satisfaire la contrainte de 20 ppb introduits dans l'ICP-MS. Pour déterminer ce facteur de dilution, la concentration moyenne en élément entre le début et la fin de chaque pic chromatographique a été calculée dans l'échantillon test, après analyse par HILIC ESI-MS. La répartition des espèces a été calculée d'après la méthode établie au chapitre IV (Équation 7 ; chapitre IV) . La Figure 59 présente la séparation de l'échantillon test et le Tableau 28 les données permettant le calcul de ces concentrations post-colonne.

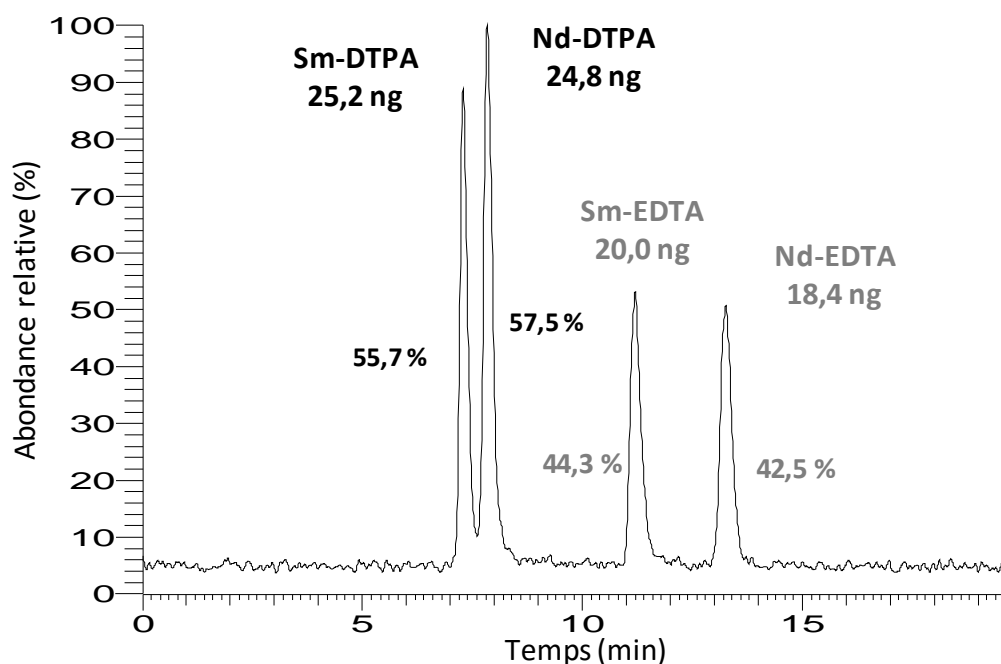


Figure 59 : séparation des complexes Sm-DTPA, Nd-DTPA, SM-EDTA et Nd-EDTA par HILIC ESI-MS. Phase stationnaire Acquity (100 x 2,1 mm ; 1,7  $\mu$ m). Phase mobile : 70/30 (v/v) acétonitrile/eau ; 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium ; 0,5 % d'acide formique. Débit : 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. V<sub>inj</sub> : 3  $\mu$ L.

Élément	m <sub>inj</sub> (ng)	Espèces	Répartition (%)	m <sub>espèce</sub>	w (min)	V <sub>pic</sub> (mL)	C <sub>post</sub> (ppb)
Sm	45,2	Sm-DTPA	55,7	25,2	0,72	0,216	134
		Sm-EDTA	44,3	20,0	0,78	0,234	99
Nd	43,2	Nd-DTPA	57,5	24,8	0,83	0,249	115
		Nd-EDTA	42,5	18,4	0,70	0,21	101

Tableau 28 : concentration moyenne en élément entre le début et la fin de chaque pic chromatographique avec m<sub>inj</sub> la masse d'élément injectée ; m<sub>espèce</sub> la masse d'élément au sein de chaque espèce ; w la largeur du pic chromatographique ; V<sub>pic</sub> le volume du pic chromatographique ; C<sub>post</sub> la concentration de l'élément entre le début et la fin du pic chromatographique

D'après le Tableau 28, la concentration de l'élément entre le début et la fin du pic chromatographique est respectivement de 134 ppb, 115 ppb, 99 ppb et 101 ppb pour le Sm présent au sein du complexe Sm-DTPA, le Nd présent au sein du complexe Nd-DTPA, le Sm présent au sein du complexe Sm-EDTA et le Nd présent au sein du complexe Nd-EDTA. Les concentrations en lanthanide de cet échantillon test étant situées en milieu de gamme de linéarité en ESI-MS, celles-ci sont trois fois inférieures aux concentrations de la limite haute du domaine de linéarité. Ainsi les concentrations maximales, post-colonne, en élément susceptibles d'être introduites dans l'ICP-MS sont respectivement de 402 ppb, 345 ppb, 297 ppb et 303 ppb. Afin de vérifier la contrainte de 20 ppb

introduits dans l'ICP-MS, le facteur de dilution engendré par le débit d'appoint doit être au moins de 20. Sachant que  $D_{\text{néb,max}} = 200 \mu\text{L.min}^{-1}$  alors  $D_{\text{ap}} = 190 \mu\text{L.min}^{-1}$  et  $D_{\text{ICP-MS,max}} = 10 \mu\text{L.min}^{-1}$ . Le débit provenant de la colonne étant  $D_{\text{sép}} = 300 \mu\text{L.min}^{-1}$ , la fraction de phase mobile allant vers l'ICP-MS  $\frac{1}{R+1}$  est de 3 %. Cette donnée permet d'obtenir une condition sur les diamètres des tubulures, derniers paramètres non déterminés pour le dimensionnement du partage de phase mobile. Les détails du calcul sont présentés en Équation 15.

$$\frac{1}{R+1} = 0,03 \Leftrightarrow R = 32,3 \Leftrightarrow \frac{d_{\text{ESI-MS}}^4}{d_{\text{ICP-MS}}^4} \times \frac{L_{\text{ICP-MS}}}{L_{\text{ESI-MS}}} = 32,3 \Leftrightarrow \frac{d_{\text{ESI-MS}}}{d_{\text{ICP-MS}}} = 1,8$$

**Équation 15 : calcul de la condition sur les diamètres de tubulures de l'ESI-MS et de l'ICP-MS**

D'après l'Équation 15, le rapport des diamètres est de 1,8 pour une fraction allant vers l'ICP-MS de 3%. Ce rapport ne doit pas être inférieur à cette valeur pour que la contrainte de 20 ppb introduite dans l'ICP-MS soit respectée. Par ailleurs, les diamètres ont été choisis pour être les plus faibles possibles afin de limiter les phénomènes de dispersion dans les tubulures. Parmi les tubulures en PEEK disponibles commercialement, le couple  $d_{\text{ESI-MS}} = 125 \mu\text{m}$  et  $d_{\text{ICP-MS}} = 65 \mu\text{m}$  permet d'obtenir un rapport de 1,9, en adéquation avec la valeur minimale de 1,8.

Avec ces diamètres de tubulures, les fractions de phase mobile allant vers l'ESI-MS et l'ICP-MS sont respectivement de 97,7 % et de 2,3 % soit  $D_{\text{ESI-MS}} = 293 \mu\text{L.min}^{-1}$  et  $D_{\text{ICP-MS}} = 7 \mu\text{L.min}^{-1}$ . Ainsi le débit  $D_{\text{ap}}$  a été fixé à  $140 \mu\text{L.min}^{-1}$  pour obtenir un facteur de dilution de 21.

L'ensemble des paramètres pour le dimensionnement du système de couplage ont été déterminés et sont résumés dans le Tableau 29 :

Paramètres	Valeurs
$D_{\text{sép}}$	$300 \mu\text{L.min}^{-1}$
$D_{\text{néb,max}}$	$200 \mu\text{L.min}^{-1}$
$L_{\text{ICP-MS}}$	4,6 m
$L_{\text{ESI-MS}}$	1,5 m
$d_{\text{ICP-MS}}$	$65 \mu\text{m}$
$d_{\text{ESI-MS}}$	$125 \mu\text{m}$
$D_{\text{ap}}$	$140 \mu\text{L.min}^{-1}$

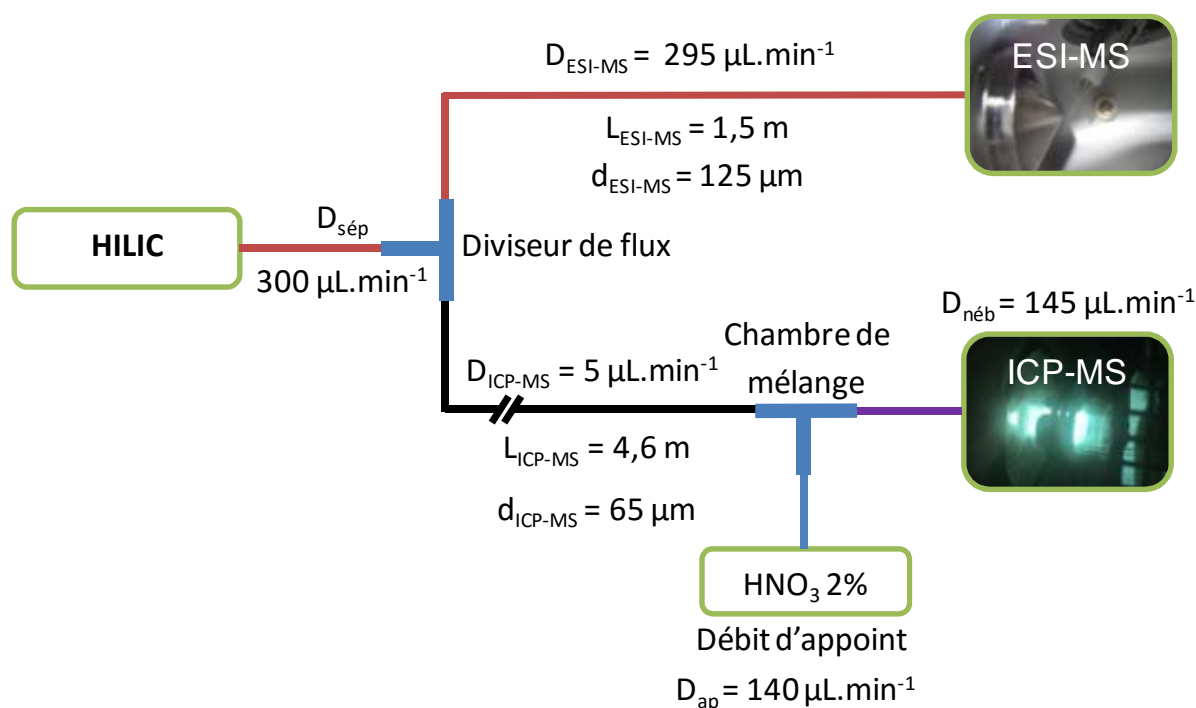
**Tableau 29: paramètres nécessaires pour le dimensionnement du système de couplage**

Les débits expérimentaux ont ensuite été mesurés et sont respectivement  $D_{\text{ESI-MS}} = 295 \mu\text{L.min}^{-1}$  et  $D_{\text{ICP-MS}} = 5 \mu\text{L.min}^{-1}$  pour l'ESI-MS et l'ICP-MS avec  $D_{\text{sép}} = 300 \mu\text{L.min}^{-1}$ , soit respectivement 98,3 % et 1,7 % pour l'ESI-MS et l'ICP-MS. Les fractions de phase



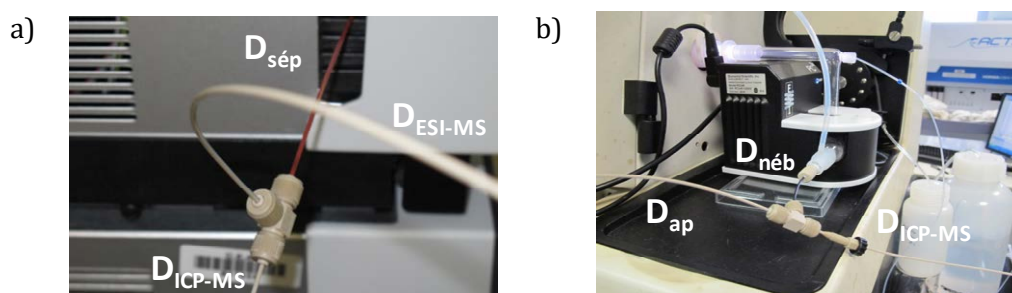
mobile obtenues expérimentalement sont en adéquation avec celles déterminées théoriquement. Le débit d'appoint a été maintenu à  $140 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ , ce qui fixe le facteur de dilution à 29, en accord avec les contraintes instrumentales.

La Figure 60 présente le schéma récapitulatif de principe du couplage simultané entre la chromatographie en mode HILIC, l'ESI-MS et l'ICP-MS :



**Figure 60 : schéma de principe du couplage simultané entre l'HILIC, l'ESI-MS et l'ICP-MS avec l'ensemble des paramètres instrumentaux**

La Figure 61 présente les deux jonctions utilisées pour réaliser le montage du couplage spécifique :



**Figure 61: a) connectique en T sans volume mort b) chambre de mélange de faible volume**

### ***1-b) Mise en œuvre du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC avec l'ICP-MS et l'ESI-MS***

Comme indiqué précédemment, l'introduction de matrice hydro-organique dans une source ICP peut nécessiter des précautions particulières afin de pouvoir obtenir des performances analytiques en termes de sensibilité et de stabilité du signal en ICP-MS les meilleures possibles [62,64,177]. Dans notre étude, le pourcentage d'acétonitrile introduit dans l'ICP-MS pour ces premiers essais dans le débit du nébuliseur est inférieur à 3 %. Ce faible pourcentage d'acétonitrile ne modifierait sans doute pas les performances de l'ICP-MS [62,64,177]. Cependant, plusieurs précautions ont été prises dans le cadre de futures analyses avec une composition en solvant organique plus élevée, à savoir supérieure à 20 %, qui pourrait impacter significativement le signal en ICP-MS. De l'oxygène a été introduit au niveau du gaz de transport de l'échantillon afin d'oxyder le carbone en CO<sub>2</sub> dans le plasma. Cet ajout permet d'éviter les dépôts de carbone au niveau de l'interface. Les cônes en nickel de l'interface de l'ICP-MS ont été remplacés par des cônes en platine, plus résistants en présence d'oxygène. La chambre de nébulisation a été refroidie à 2°C par effet Peltier afin de condenser au maximum les vapeurs de solvant organique et de réduire la charge de solvant introduite dans le plasma.

L'échantillon test a été analysé avec le système de couplage simultané. Les conditions chromatographiques sont identiques à celles du chapitre IV (annexe 4) et la colonne utilisée est la colonne Acquity (100 x 2,1 mm ; 1,7 µm). Les paramètres ESI-MS et ICP-MS ont été optimisés afin d'obtenir les signaux ESI-MS et ICP-MS les plus stables et les plus intenses possibles. Ces paramètres instrumentaux sont présentés dans Tableau 30. En ESI-MS, le mode fullscan a été utilisé et en ICP-MS, l'ensemble des isotopes du samarium et du néodyme a été analysé.

Paramètres			
ESI-MS		ICP-MS	
Mode d'acquisition	fullscan	puissance	1400 W
Tension de spray	- 4 kV	injecteur	2 mm
Gaz séchant	35 ua	gaz plasmagène	14 L.min <sup>-1</sup>
Gaz auxiliaire	30 ua	gaz auxiliaire	0,89 L.min <sup>-1</sup>
Température de vaporisation	400°C	gaz de nébulisation	1,04 L.min <sup>-1</sup>
Température du capillaire de transfert	270°C	chambre de nébulisation température	PC <sup>3x</sup> 2°C
		oxygène	4 mL.min <sup>-1</sup>
		cônes	platine

Tableau 30 : paramètres instrumentaux ESI-MS et ICP-MS en couplage simultané

La Figure 62 présente les chromatogrammes de la séparation par HILIC obtenus simultanément par ESI-MS et ICP-MS.

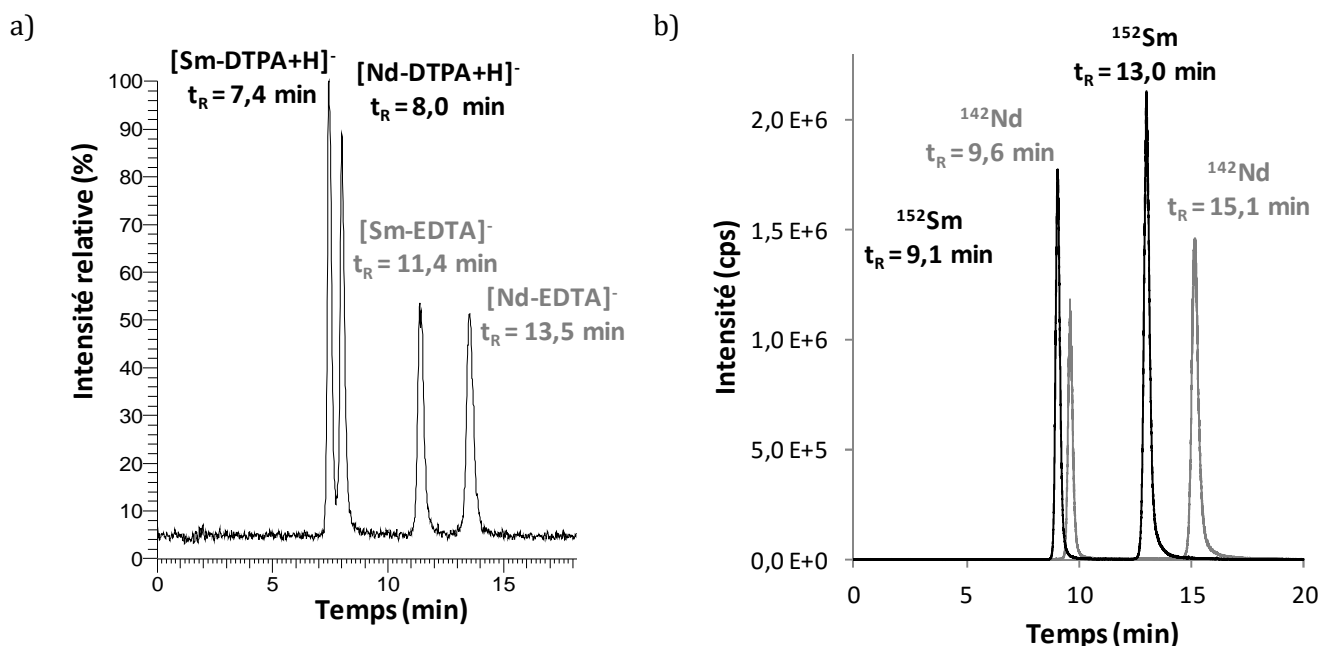
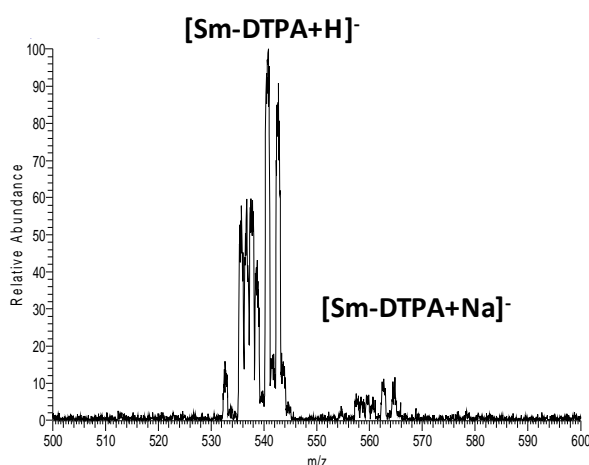


Figure 62 : Séparation en mode isocratique des complexes Sm-DTPA, Sm-EDTA, Nd-DTPA et Nd-EDTA par HILIC couplée simultanément à a) l'ESI-MS et b) l'ICP-MS. Colonne Acquity (100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m), 70/30 (v/v) acétonitrile/eau [NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO] = 15 mmol.L<sup>-1</sup> 0,5 % d'acide formique. Débit = 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. V<sub>inj</sub> = 3  $\mu$ L; Proportion Ln:EDTA:DTPA 2:1,75:0,75 ; [Sm] = [Nd] = 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>

D'après la Figure 62, on remarque que les temps de rétention entre l'ESI-MS et l'ICP-MS sont décalés de 1,6 min, du fait de la longueur de 4,6 m de la tubulure en ICP-MS et du débit de 5  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> amenant la phase mobile dans la chambre de nébulisation. Les épaulements des pics chromatographiques observés en ICP-MS (Figure 62b) peuvent être dus aux phénomènes de dispersion à cause de la longueur de la tubulure mais également à cause de la chambre de nébulisation comme décrit dans la littérature, lors de la mise au point d'un couplage entre la RP-HPLC et les spectromètres de masse APCI-

MS et ICP-MS [131]. Malgré ces différences entre l'ESI-MS et l'ICP-MS, le système de couplage ne détériore pas les performances de séparation engendrées par la colonne chromatographique. La séparation des espèces en ESI-MS et en ICP-MS est satisfaisante. Par ailleurs, aucune autre espèce de samarium et de néodyme n'a été détectée par ESI-MS et par ICP-MS, ce qui confirme la complexation totale des lanthanides par les ligands DTPA et EDTA.

Ce développement instrumental permet d'obtenir des informations de spéciation exhaustives grâce à la complémentarité des spectromètres de masse. L'ESI-MS permet une analyse structurale des espèces séparées comme le montre, par exemple, le spectre de masse du Sm-DTPA présenté en Figure 63 issu du pic chromatographique de la séparation (Figure 62).



**Figure 63 : spectre de masse ESI-MS en mode d'ionisation négatif de Sm-DTPA**

Ainsi l'ESI-MS permet d'atteindre la stœchiométrie et la charge des complexes ainsi que la nature des ligands coordonnés. Par ailleurs, l'ICP-MS permet d'obtenir des informations élémentaires et isotopiques des éléments contenus dans chaque complexe. En effet, l'ICP-MS permet de détecter les isotopes des éléments présents au cours de la séparation. L'analyse des rapports isotopiques du samarium et du néodyme est actuellement en cours de traitement.

Les résultats obtenus par HILIC ESI-MS au cours de cette étude peuvent également être comparés à ceux obtenus par HILIC ESI-MS mis en évidence le chapitre précédent (chapitre IV) afin d'évaluer l'impact de ce système de couplage sur les dispersions extra-colonne. Ainsi la résolution ( $R_s$ ) et l'efficacité par le biais du nombre de plateaux théoriques ( $N$ ) ont été calculées pour les séparations présentées en Figure 62 et en Figure 45 (chapitre IV). Ces données sont présentées dans le Tableau 31. Les facteurs de

rétenion et de sélectivité dépendant essentiellement de la séparation chromatographique ; ils sont identiques pour les deux systèmes et ne sont pas présentés dans le Tableau 31.

Espèces	Rs		N	
	HILIC ESI-MS seul	HILIC ESI-MS couplage	HILIC ESI-MS seul	HILIC ESI-MS couplage
Sm-DTPA	1,5	1,2	3011	2912
Nd-DTPA			5878	5619
Sm-EDTA	7,1	6,2	3643	3492
Nd-EDTA			4400	4773

**Tableau 31 : données chromatographiques de la séparation des complexes Sm-DTPA, Sm-EDTA, Nd-DTPA et Nd-EDTA par HILIC ESI-MS seul et par HILIC ESI-MS avec le système de couplage simultané. Les formules appliquées pour le calcul de Rs et N sont mentionnées en annexe 3.**

D'après ce tableau, on peut remarquer que les données obtenues par HILIC ESI-MS au chapitre IV et celles obtenues avec le système de couplage spécifique sont similaires. Ainsi le dispositif instrumental n'impacte pas la résolution et l'efficacité de la séparation et n'introduit donc que peu d'effets de dispersion.

*La faisabilité du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC à l'ESI-MS et à l'ICP-MS pour l'analyse de spéciation des lanthanides a été démontrée. Un dispositif de couplage simultané spécifique a été mis au point à l'aide d'un échantillon témoin en tenant compte des contraintes spécifiques de chaque instrument et de longueurs de tubulures. Le diviseur de flux permet de scinder le débit de phase mobile dont 98,3 % dirigé vers l'ESI-MS et 1,7 % dirigé vers l'ICP-MS. Un débit d'appoint d'acide nitrique 2 % (w/w) a été ajouté en amont de la chambre de nébulisation afin de diluer l'échantillon avant l'analyse par ICP-MS. Ce débit permet également de diminuer la charge en solvant organique introduite dans la source de l'ICP-MS mais également d'adapter le débit du nébuliseur de l'ICP-MS. Malgré le faible pourcentage de solvant organique introduit dans l'ICP-MS pour ces premiers essais, de l'oxygène a été ajouté au niveau du gaz de nébulisation, la chambre de nébulisation a été refroidie à 2°C et des cônes en platine ont été utilisés. Les complexes de samarium et de néodyme à ligands DTPA et EDTA ont été séparés et caractérisés par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS simultanément. La séparation n'est pas modifiée par le système de couplage comparativement à la séparation obtenue au chapitre précédent. Par ailleurs, les 4,6 m de longueur de tubulures ainsi que le débit de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  amenant la phase mobile vers l'ICP-MS n'engendrent qu'une augmentation du temps de rétention de 1,6 min et de faibles effets de dispersion observables au niveau des épaulements des pics chromatographiques.*

*Des premiers essais de quantification simultanée ont ensuite été réalisés par le biais de ce montage et sont présentés dans le prochain paragraphe.*

## **2 Premiers essais de quantification des complexes de lanthanides en parallèle par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS**

Les développements préliminaires d'une première méthode de quantification simultanée par ESI-MS et ICP-MS des complexes de lanthanides à ligands DTPA et EDTA ont été réalisés. Les développements effectués au chapitre IV ont été repris. Par conséquent, une méthode par étalonnage externe sans étalon interne a été envisagée à cause de la modification de la distribution des espèces lors de l'ajout d'un étalon interne. Le système d'étude est identique à celui du chapitre IV et les proportions lanthanide:EDTA:DTPA sont 2:1,75:0,75. Les paramètres ESI-MS et ICP-MS ont été optimisés et sont identiques à ceux présentés dans le Tableau 30. Les performances

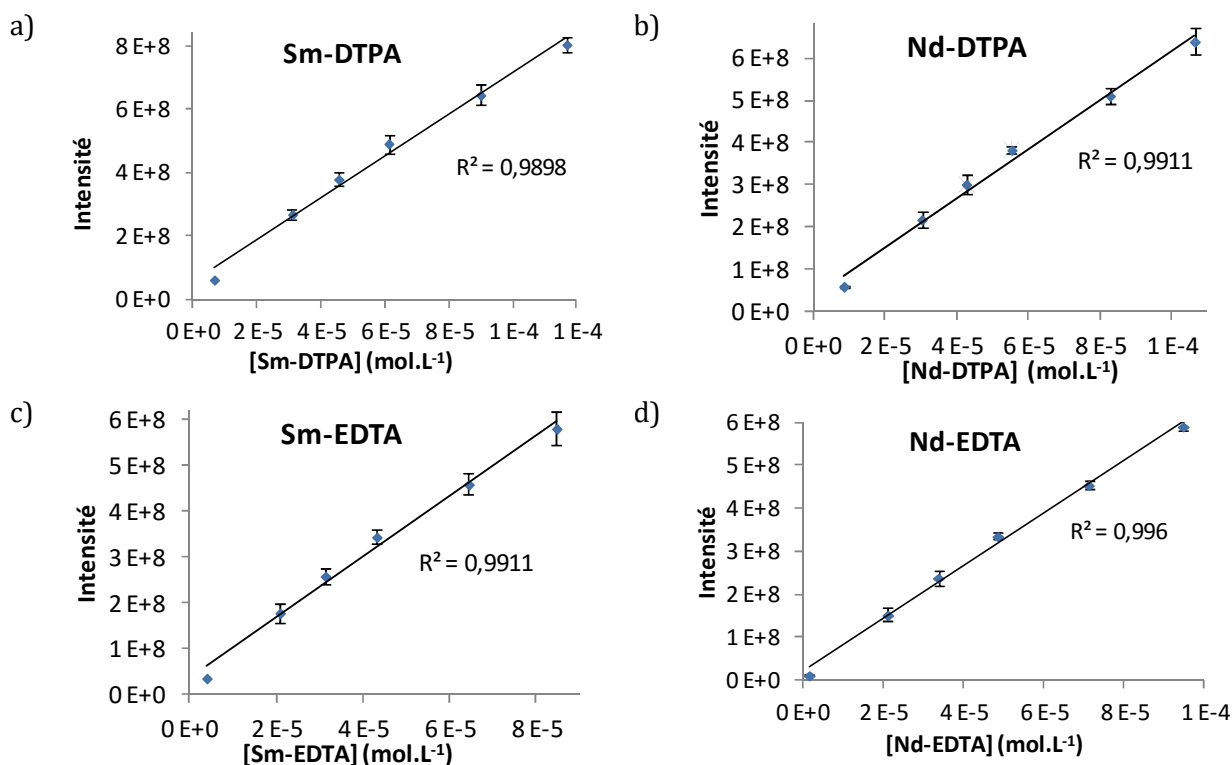
analytiques obtenues en termes de linéarité, de répétabilité et de justesse par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS simultanément sont présentés dans cette partie.

### ***2-a) HILIC ESI-MS***

Afin de déterminer les performances analytiques de cette méthode de quantification par HILIC ESI-MS, six niveaux de concentration ont été sélectionnés dans le domaine de linéarité de l'ESI-MS déterminé au chapitre IV. La gamme de concentration de la droite d'étalonnage s'étend de  $2.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> à  $4.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total ([Sm] = [Nd]) (annexe 4). Trois droites d'étalonnage ont été réalisées (trois répliques) et une droite d'étalonnage moyenne a été calculée à partir des trois premières. Cela a permis d'obtenir des écarts types de concentrations pour chaque niveau de concentration. Les concentrations ont été calculées par la méthode présentée au chapitre IV (Équation 8, chapitre IV), cette méthode reposant sur l'égalité des rendements d'ionisation des complexes de lanthanides.

#### **2-a-1) Linéarité de la réponse du signal**

La linéarité de la droite d'étalonnage moyenne a été vérifiée par les tests employés au chapitre IV, à savoir l'ANOVA et la prédominance du terme quadratique [63] ; les coefficients de régression linéaire ont également été déterminés. La Figure 64 présente les droites d'étalonnage moyennes pour l'ensemble des complexes.



**Figure 64 : droites d'étalonnage moyennes des complexes a) Sm-DTPA b) Nd DTPA c) Sm-EDTA d) Nd-EDTA. Les barres d'erreur associées à chaque niveau de concentration sont également présentées.**

La Figure 64 montre que les écarts-types associés à chaque niveau de concentration sont inférieures à 10%. De plus les tests statistiques sont validés sur l'ensemble du domaine de quantification. Cette linéarité du signal en ESI-MS est en adéquation avec les résultats obtenus au chapitre IV

#### 2-a-2) Répétabilité et justesse de la mesure

Afin de déterminer la répétabilité et la justesse de la mesure, un échantillon de contrôle situé au centre du domaine de quantification, à savoir  $2 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total ([Sm] = [Nd]) (annexe 4), a été analysé après le dernier niveau de concentration de chaque droite d'étalonnage, soit trois répliques. Concernant la répétabilité, celle-ci a été obtenue à partir de l'écart-type sur les intensités mesurées pour chaque réplique.

Les données de répétabilité des mesures des complexes de samarium et de néodyme à ligands DTPA et EDTA sont affichées dans le Tableau 32.



	Répétabilité
Complexes	Écart-type (%)
Sm-DTPA	1,0
Nd-DTPA	2,7
Sm-EDTA	3,8
Nd-EDTA	2,9

**Tableau 32 : répétabilité de la mesure des complexes Sm-DTPA, Nd-DTPA, Sm-EDTA et Nd-EDTA**

Les données du Tableau 32 indiquent que la répétabilité de la mesure du niveau de contrôle est inférieure à 4 % pour l'ensemble des complexes. Les résultats obtenus sont comparables à ceux concernant la stabilité de la courbe d'étalonnage présentés au chapitre IV.

En ce qui concerne la justesse, celle-ci est évaluée pour chaque droite d'étalonnage soit trois fois et également avec la droite d'étalonnage moyenne, à l'aide de l'Équation 16.

$$justesse = \frac{C_{ét} - C_{éch}}{C_{éch}}$$

**Équation 16 : calcul de la justesse avec  $C_{ét}$  la concentration obtenue avec la droite d'étalonnage et  $C_{éch}$  la concentration dans l'échantillon**

Les données de la justesse des mesures pour chaque réplique et pour la droite d'étalonnage moyenne sont présentées dans le Tableau 33.

	Justesse (%)			
Complexes	1 <sup>ère</sup> réplique	2 <sup>ème</sup> réplique	3 <sup>ème</sup> réplique	étalonnage moyen
Sm-DTPA	15,7	10,0	6,9	8,5
Nd-DTPA	7,2	6,3	5,6	5,9
Sm-EDTA	14,9	10,6	8,3	9,5
Nd-EDTA	7,7	6,9	6,1	6,5

**Tableau 33 : justesse de la mesure des complexes Sm-DTPA, Nd-DTPA, Sm-EDTA et Nd-EDTA**

Les justesses obtenues sont de l'ordre de 10 %. Les données de ce tableau montrent également une variabilité importante des justesses entre les trois répliques.

Ces résultats sont préliminaires en raison du faible nombre de répliques réalisé ; des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer les résultats de répétabilité et de justesse obtenus par HILIC ESI-MS.

## 2-b) HILIC ICP-MS

Contrairement à l'ESI-MS, l'ICP-MS mesure l'intensité d'isotopes d'éléments contenus dans les complexes. Dans cette étude, seuls les isotopes non interférés du samarium et du néodyme ont été analysés afin d'éviter les phénomènes de recouvrements entre les pics chromatographiques pouvant modifier la quantification de l'espèce (Tableau 34).

	<b>Abondance des isotopes de l'élément (%)</b>	
Masse des isotopes	Samarium (Sm)	Néodyme (Nd)
142		<b>27,2</b>
143		<b>12,2</b>
144	3,1	23,8
145		<b>8,3</b>
146		<b>17,2</b>
147	<b>15,0</b>	
148	11,2	5,7
149	<b>13,8</b>	
150	7,4	5,6
152	<b>26,7</b>	
154	<b>22,8</b>	

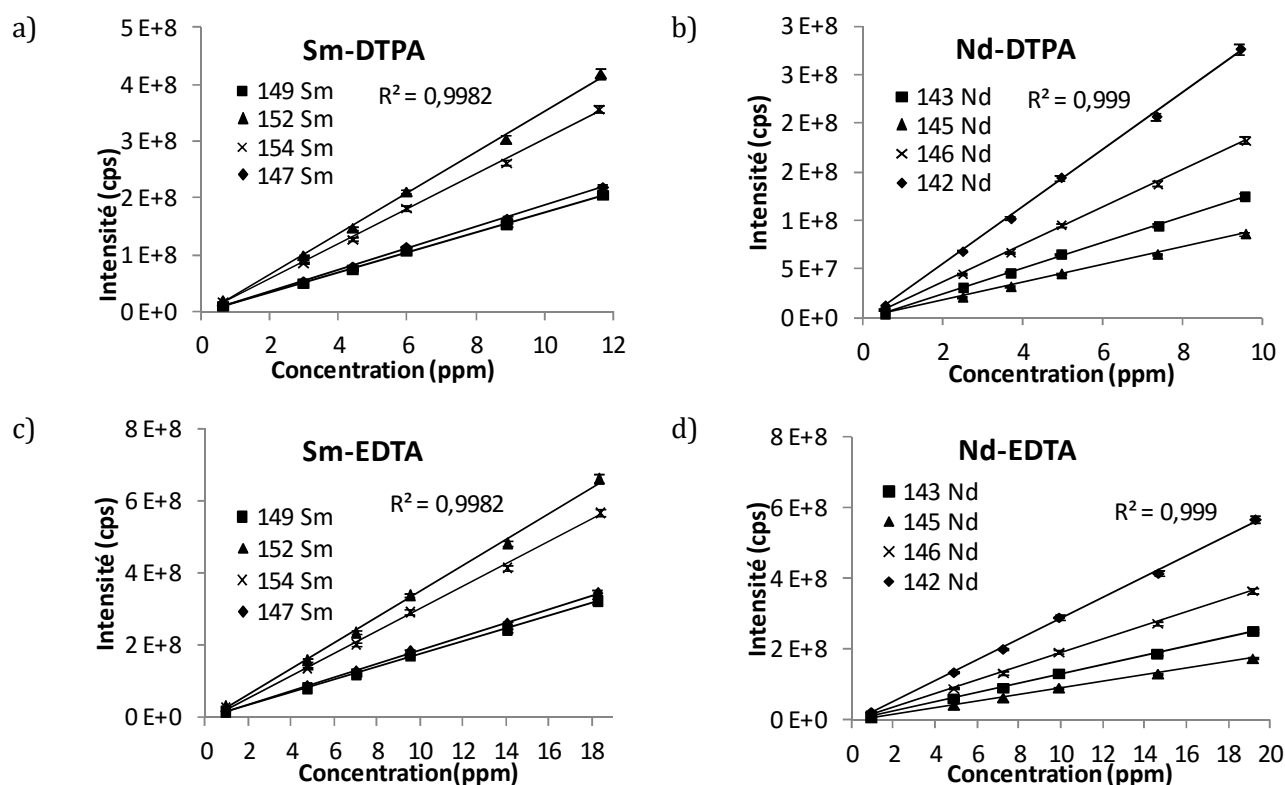
**Tableau 34 : isotopes du samarium et du néodyme analysés avec leurs abondances isotopiques naturelles. En gras les isotopes non interférés.**

Les performances analytiques en termes de linéarité, de répétabilité et de justesse de la mesure ont également été déterminées de manière simultanée par HILIC ICP-MS. Ainsi, de même qu'en ESI-MS, trois droites d'étalonnage ont été mesurées. Les six niveaux de concentrations ont donc été analysés trois fois. Une droite d'étalonnage moyenne a également été calculée ainsi que les écarts-types de concentrations pour chaque niveau de concentration. Les concentrations en élément sont données dans ce paragraphe en ppm et la gamme d'étalonnage s'étend d'environ 3 ppm à 60 ppm en lanthanide total (annexe 4). La méthodologie de calcul des concentrations en ICP-MS est identique à celle présentée au chapitre IV pour l'ESI-MS. Ainsi l'intensité des complexes a été obtenue par intégration des intensités de chaque pic chromatographique et la concentration de chaque complexe est calculée à partir de la concentration en élément corrigée de la répartition de ce dernier sous cette forme (Équation 8 ; chapitre IV).

### 2-b-1) Linéarité de la réponse du signal

La linéarité du signal en ICP-MS a été vérifiée par tests statistiques pour chaque isotope non interféré des lanthanides contenus dans les complexes. La Figure 65 présente les droites d'étalonnage moyennes de chaque isotope de l'ensemble des

complexes. Les coefficients de régression linéaire ont également été déterminés et seul le coefficient de régression linéaire le plus faible est présenté sur la Figure 65 :



**Figure 65 : droites d'étalonnage moyennes de chaque isotope de lanthanide pour les complexes a) Sm-DTPA b) Nd DTPA c) Sm-EDTA d) Nd-EDTA. Les barres d'erreur associées à chaque niveau de concentration sont également présentées.**

Les tests statistiques ont été validés pour l'ensemble des isotopes mesurés. Les écarts-types de chaque niveau de concentration sont inférieurs à 5 %. Les droites d'étalonnage par HILIC ICP-MS suivent ainsi un modèle linéaire sur l'ensemble du domaine de quantification, d'environ 3 ppm à 60 ppm en lanthanide total.

Par ailleurs, cette expérience a permis d'estimer la limite de détection du samarium et du néodyme par ICP-MS (exprimée en  $\frac{3\sigma_{blanc}}{b}$ , annexe 3). Les LOD pour l'ensemble des complexes sont de l'ordre de la dizaine de ppt soit environ  $1.10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup>. Ces LOD sont en accord avec celles obtenues pour la quantification d'agents de contraste à base de gadolinium par HILIC ICP-MS, où des LOD de  $1.10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup> ont été obtenues [114,120]. Pour rappel, les LOD des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS déterminées au chapitre précédent sont de  $5.10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup> pour les complexes de DTPA et inférieurs à  $5.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> pour les complexes d'EDTA.

## 2-b-2) Répétabilité et justesse de la mesure

La répétabilité et la justesse des mesures ont été évaluées à partir de l'échantillon de contrôle situé au centre de la droite d'étalonnage, soit environ 30 ppm en lanthanide total, comme par HILIC ESI-MS. La répétabilité a été calculée à l'aide des intensités mesurées de cet échantillon de contrôle grâce à l'écart-type sur les trois mesures. La justesse a été calculée à partir de l'Équation 16 pour chaque mesure. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 35 pour la répétabilité de la mesure et dans le Tableau 36 pour la justesse de la mesure.

Répétabilité								
complexes	Sm-DTPA				Nd-DTPA			
isotopes	<sup>147</sup> Sm	<sup>149</sup> Sm	<sup>152</sup> Sm	<sup>154</sup> Sm	<sup>142</sup> Nd	<sup>143</sup> Nd	<sup>145</sup> Nd	<sup>146</sup> Nd
écart-type (%)	1,6	1,2	1,3	1,3	0,5	0,8	0,6	0,6
complexes	Sm-EDTA				Nd-EDTA			
isotopes	<sup>147</sup> Sm	<sup>149</sup> Sm	<sup>152</sup> Sm	<sup>154</sup> Sm	<sup>142</sup> Nd	<sup>143</sup> Nd	<sup>145</sup> Nd	<sup>146</sup> Nd
écart-type (%)	1,5	1,4	1,5	1,4	0,8	0,7	0,8	1,1

**Tableau 35 : répétabilité de la mesure de l'échantillon de contrôle de chaque isotope contenu dans les complexes**

La répétabilité de la mesure en HILIC ICP-MS est de l'ordre de 1 % pour chaque isotope contenu dans les complexes.

	Justesse (%)							
	1 <sup>ère</sup> réplique							
complexes	Sm-DTPA				Nd-DTPA			
isotopes	<sup>147</sup> Sm	<sup>149</sup> Sm	<sup>152</sup> Sm	<sup>154</sup> Sm	<sup>142</sup> Nd	<sup>143</sup> Nd	<sup>145</sup> Nd	<sup>146</sup> Nd
Justesse (%)	-4,0	-4,1	-5,0	-4,6	-4,9	-4,0	-3,9	-4,2
complexes	Sm-EDTA				Nd-EDTA			
isotopes	<sup>147</sup> Sm	<sup>149</sup> Sm	<sup>152</sup> Sm	<sup>154</sup> Sm	<sup>142</sup> Nd	<sup>143</sup> Nd	<sup>145</sup> Nd	<sup>146</sup> Nd
Justesse (%)	-4,0	-4,1	-5,0	-4,6	-5,0	-4,0	-3,9	-4,2
	2 <sup>ème</sup> réplique							
complexes	Sm-DTPA				Nd-DTPA			
isotopes	<sup>147</sup> Sm	<sup>149</sup> Sm	<sup>152</sup> Sm	<sup>154</sup> Sm	<sup>142</sup> Nd	<sup>143</sup> Nd	<sup>145</sup> Nd	<sup>146</sup> Nd
Justesse (%)	-0,5	-0,4	-1,7	-1,3	-0,1	0,2	-4,2	0,5
complexes	Sm-EDTA				Nd-EDTA			
isotopes	<sup>147</sup> Sm	<sup>149</sup> Sm	<sup>152</sup> Sm	<sup>154</sup> Sm	<sup>142</sup> Nd	<sup>143</sup> Nd	<sup>145</sup> Nd	<sup>146</sup> Nd
Justesse (%)	-0,5	-0,4	-1,6	-1,3	-0,3	0,1	0,7	0,4
	3 <sup>ème</sup> réplique							
complexes	Sm-DTPA				Nd-DTPA			
isotopes	<sup>147</sup> Sm	<sup>149</sup> Sm	<sup>152</sup> Sm	<sup>154</sup> Sm	<sup>142</sup> Nd	<sup>143</sup> Nd	<sup>145</sup> Nd	<sup>146</sup> Nd
Justesse (%)	0,7	0,7	-0,5	-0,2	0,8	1,8	2,1	2,2
complexes	Sm-EDTA				Nd-EDTA			
isotopes	<sup>147</sup> Sm	<sup>149</sup> Sm	<sup>152</sup> Sm	<sup>154</sup> Sm	<sup>142</sup> Nd	<sup>143</sup> Nd	<sup>145</sup> Nd	<sup>146</sup> Nd
Justesse (%)	0,7	0,8	-0,5	-0,2	0,7	1,7	2,0	2,2

**Tableau 36 : données de justesse pour chaque réplique et pour chaque isotope contenu dans les complexes**

D'après le Tableau 36, les justesses des mesures pour chaque isotope de lanthanides contenus dans les complexes des deux dernières répliques sont similaires et de l'ordre de 1 %, alors que celle de la première est plus élevée et de l'ordre de 4 %. Des justesses plus élevées ont également été obtenues par HILIC ESI-MS lors de la première réplique. Une explication potentielle de ces résultats serait que les pertes de justesse ont été engendrées en amont des spectromètres de masse, soit au niveau du diviseur de flux, soit au niveau de la colonne chromatographique, soit au niveau de l'injection. Ces pertes peuvent également être liées à une fluctuation du débit imposée par les pompes chromatographiques.

*Les premiers essais de développement d'une méthode de quantification simultanée par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS des complexes de Sm-DTPA, Sm-EDTA, Nd-DTPA et Nd-EDTA contenus dans un même échantillon ont été réalisés. L'ESI-MS permet de caractériser et de quantifier directement les complexes préalablement séparés tandis que l'ICP-MS ne permet qu'une caractérisation et qu'une quantification des isotopes de samarium et de néodyme contenus dans les complexes. Ainsi, les spectromètres ESI-MS et ICP-MS permettent d'obtenir des informations complémentaires.*

*La linéarité, la répétabilité ainsi que la justesse par HILIC ESI-MS et ICP-MS ont été évaluées. Concernant la linéarité, celle-ci a été validée sur l'ensemble du domaine de quantification, aussi bien par HILIC ESI-MS que par HILIC ICP-MS. La répétabilité et la justesse de la mesure par HILIC ESI-MS sont respectivement inférieures à 4% et de l'ordre de 10 %. Par HILIC ICP-MS, la réponse du signal est linéaire avec l'ensemble des niveaux de concentration entre environ 3 et 60 ppm en lanthanide total. Les LOD en ICP-MS sont de l'ordre de la dizaine de ppt, soit de l'ordre de  $1.10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup> pour l'ensemble des complexes de lanthanides. La répétabilité et la justesse de la mesure sont de l'ordre de 1 %, à l'exception des résultats obtenus lors de la première réplique. Ces données constituent des résultats préliminaires satisfaisants.*

### **3 Distribution des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS**

La détermination de la distribution des éléments sous les formes chimiques présentes dans un échantillon constitue une information importante en analyse de spéciation. Ainsi les distributions des complexes de lanthanides dans les échantillons de la gamme d'étalonnage ont été évaluées en ESI-MS et en ICP-MS.

#### ***3-a) Distribution des espèces obtenues avec chaque spectromètre de masse***

Afin de pouvoir valider les résultats obtenus avec chaque instrument, la distribution des espèces dans l'échantillon test (Partie I) a été simulée à l'aide du logiciel PhreeqC, des constantes de stabilité issues de la database 46 de la NIST [15] et des données thermodynamiques recensées par Anderegg *et al.* [16]. Le diagramme de spéciation de cet échantillon ainsi que la distribution des espèces à pH 3,2 sont présentés en Figure 66.

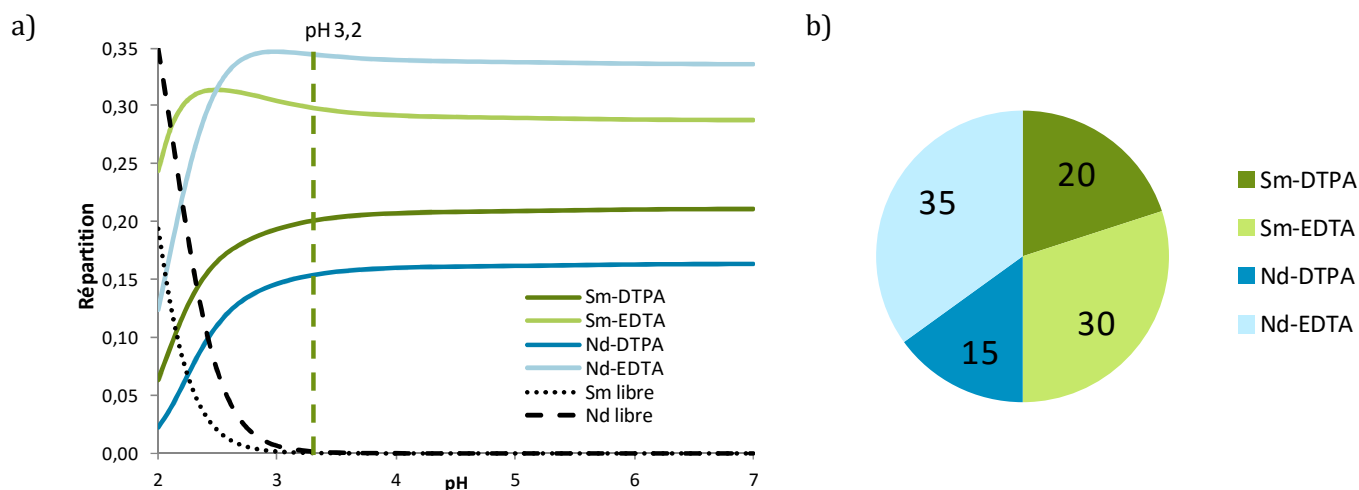


Figure 66 : a) diagramme de spéciation de l'échantillon test ; b) distribution des espèces dans l'échantillon test à pH 3,2

Les proportions dans l'échantillon étant lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75, le ligand DTPA est en défaut par rapport à l'EDTA : les complexes d'EDTA sont donc en plus grande proportion que les complexes de DTPA comme le montre la Figure 66a. Par ailleurs à pH 3,2, la proportion des formes libres est inférieure à 0,3 %.

Pour déterminer la proportion d'un complexe d'un lanthanide dans un échantillon en ESI-MS et en ICP-MS, l'Équation 17 a été utilisée :

$$\% Ln_A - ligand_1 = \frac{[Ln_A - ligand_1]}{\sum_i \sum_n [Ln_i - ligand_n]}$$

Équation 17 : proportion de complexe  $Ln_A$ -ligand<sub>1</sub> avec  $\sum_i \sum_n [Ln_i$ -ligand<sub>n</sub>] la concentration totale en espèces dans l'échantillon

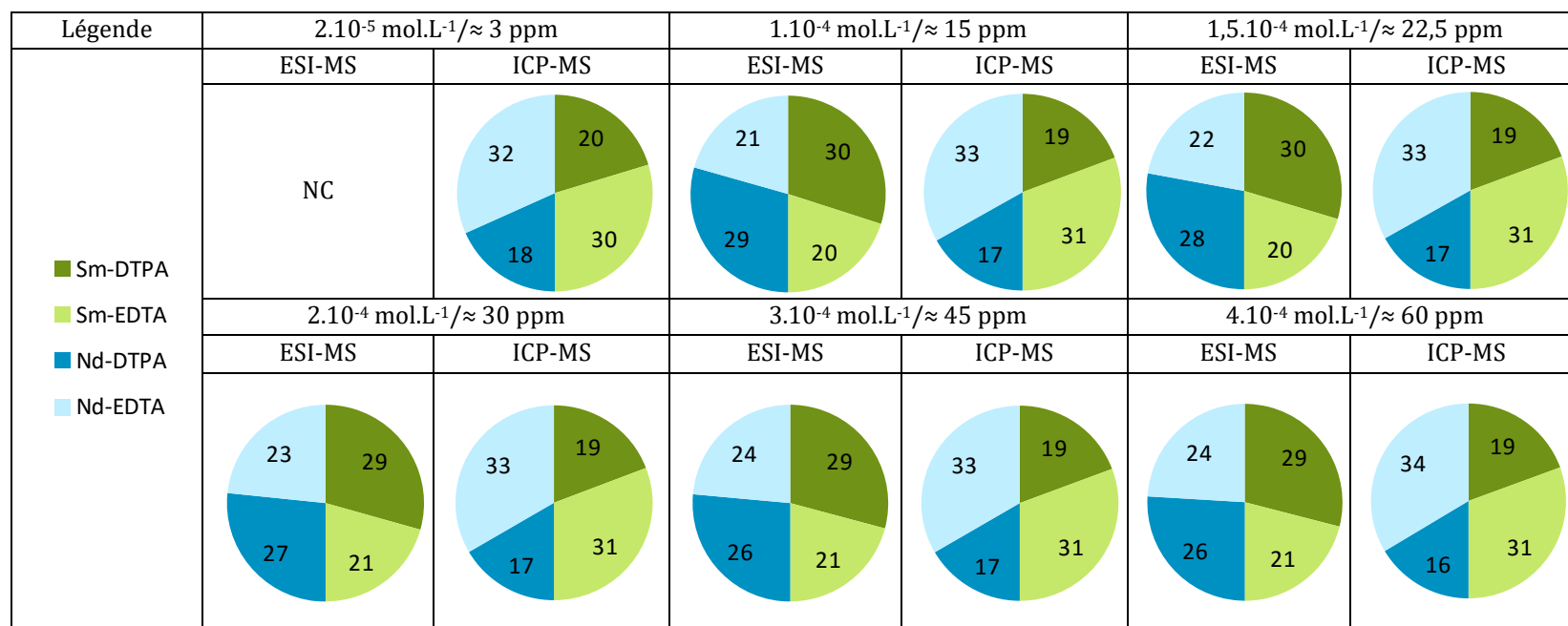
Pour rappel, les calculs des concentrations en ESI-MS sont fondés sur l'hypothèse selon laquelle les rendements d'ionisation sont égaux pour l'ensemble des complexes de lanthanides.

Le niveau 1 de concentration, à savoir  $2.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> soit environ 3 ppm en lanthanide total, étant proche de la LOQ en ESI-MS pour les complexes d'EDTA, il n'a pas été pris en compte dans cette partie.

Pour chaque niveau de concentration, la distribution moyenne des complexes sur les trois répliques a été calculée à partir de l'Équation 17. La répartition moyenne sur l'ensemble des niveaux de concentrations a également été déterminée ainsi que l'écart-type sur cette valeur. Les données de répartition sont regroupées dans le Tableau 37 et la Figure 67 présente les diagrammes de distribution associés.

concentration en lanthanide total	proportion (%)															
	2.10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> ≈ 3 ppm		1.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ≈ 15 ppm		1,5.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ≈ 22,5 ppm		2.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ≈ 30 ppm		3.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ≈ 45 ppm		4.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup> ≈ 60 ppm		moyenne		écart-type	
Complexes	ESI-MS	ICP-MS	ESI-MS	ICP-MS	ESI-MS	ICP-MS	ESI-MS	ICP-MS	ESI-MS	ICP-MS	ESI-MS	ICP-MS	ESI-MS	ICP-MS	ESI-MS	ICP-MS
Sm-DTPA	NC	20	30	19	30	19	29	19	29	19	29	19	29	19	1	2
Nd-DTPA	NC	18	29	17	28	17	27	17	26	17	26	16	27	17	2	4
Sm-EDTA	NC	30	20	31	20	31	21	31	21	31	21	31	21	31	5	1
Nd-EDTA	NC	32	21	33	22	33	23	33	24	33	24	34	23	33	6	2

**Tableau 37 : proportions de complexes mesurées par ESI-MS et par ICP-MS par niveau de concentration et proportions moyennes avec l'écart-type ; NC : non calculé**



**Figure 67 : distribution des complexes de lanthanides selon le niveau de concentration. NC : non calculé**



Les données de la Figure 67 indiquent que :

- en ICP-MS les complexes d'EDTA sont majoritaires, alors qu'en ESI-MS ce sont les complexes de DTPA ;
- la répartition calculée à partir des données ICP-MS est différente de celle calculée avec les données ESI-MS ;
- la répartition des espèces obtenue par ICP-MS est la même, quelle que soit la concentration.

Par ailleurs, les pourcentages calculés par ICP-MS ont un écart à la théorie de l'ordre de 5 % tandis que ceux en ESI-MS présente un écart de l'ordre de 50 %. Ainsi l'hypothèse faite en ESI-MS selon laquelle les rendements d'ionisation sont égaux pour l'ensemble des complexes de lanthanides ne semble pas être valide. Afin de vérifier ce résultat, les réponses des complexes de lanthanides ont donc été évaluées par ICP-MS et par ESI-MS.

Concernant l'ICP-MS, il est décrit dans la littérature que la forme chimique d'un élément n'induit pas de changement au niveau du signal de l'élément en ICP-MS [178]. Ceci a été confirmé expérimentalement par l'analyse d'échantillons de samarium et de néodyme seuls et complexés par le DTPA et l'EDTA en ICP-MS avec les paramètres instrumentaux (annexe 4).

### ***3-b) Réponse des complexes de lanthanides en ESI-MS***

Afin de confirmer que l'hypothèse faite sur l'égalité des rendements d'ionisation des complexes de lanthanides en ESI-MS n'est pas valide, la réponse du signal des différents complexes de lanthanides en ESI MS a été déterminée. À cette fin, quatre échantillons contenant chacun un lanthanide à une concentration de  $1.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> en présence d'un ligand en proportion Ln:ligand 1:1,25 ont été préparés (annexe 4). Ces échantillons ont été analysés par ESI-MS en injection directe. Les paramètres ESI-MS ont été optimisés et sont présentés dans le Tableau 38:

Paramètres ESI-MS	Valeurs
Mode d'acquisition	fullscan
Tension de spray	- 3,5 kV
Gaz séchant	10 ua
Gaz auxiliaire	5 ua
Température de vaporisation	50°C
Température du capillaire de transfert	250°C

**Tableau 38 : paramètres instrumentaux de l'ESI-MS en injection directe**

Les intensités des ions espèces majoritaires pour chaque complexe, à savoir [Sm-DTPA+H]<sup>+</sup>, [Nd-DTPA+H]<sup>+</sup>, [Sm-EDTA]<sup>-</sup> et [Nd-EDTA]<sup>-</sup>, ont été mesurées sur une minute et l'écart-type représentant la variation du signal au cours de l'acquisition a été calculé. Les données sont reportées dans le Tableau 39.

complexes	Intensité	écart-type (%)	rapport d'intensité Ln-EDTA /Ln-DTPA
Sm-DTPA	6,9.10 <sup>7</sup>	4,1	0,33
Sm-EDTA	2,3.10 <sup>7</sup>	4,5	
Nd-DTPA	6,1.10 <sup>7</sup>	4,2	0,33
Nd-EDTA	2,0.10 <sup>7</sup>	4,6	

**Tableau 39 : intensité du signal des complexes de lanthanides**

Les données du Tableau 39 montrent que pour une même concentration, le signal des complexes de DTPA est trois fois plus intense que celui des complexes d'EDTA. Ainsi les complexes d'EDTA ont un rendement d'ionisation trois fois plus faible que celui des complexes de DTPA.

Pour calculer la concentration d'un analyte dans un échantillon contenant plusieurs espèces, le rendement d'ionisation des complexes de lanthanides doit être pris en compte par ESI-MS. Ainsi, Il est nécessaire d'introduire un facteur correctif permettant de normaliser l'ensemble des signaux entre eux. Pour calculer la proportion d'une espèce par ESI-MS, l'Équation 18 a donc été utilisée :

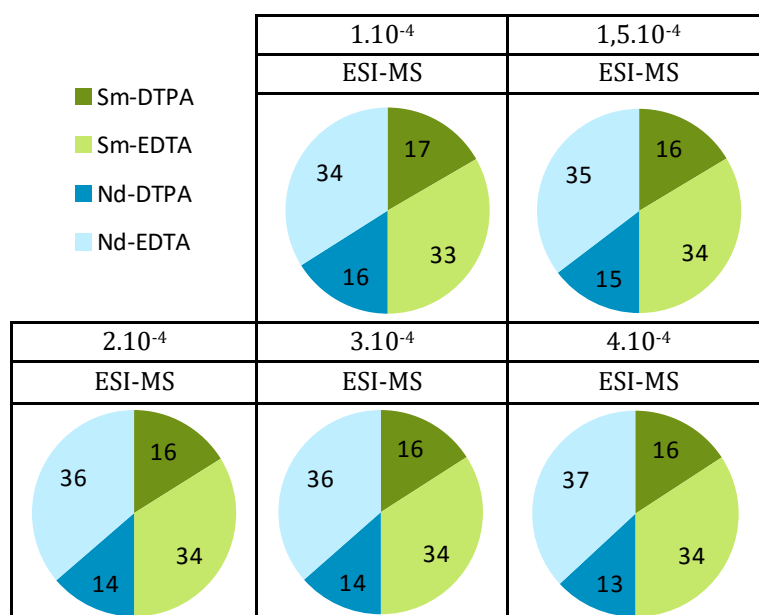
$$\% Ln_A - ligand_1 = \frac{[Ln_A - ligand_1]}{\alpha \sum_i [Ln_i - ligand_1] + \sum_i [Ln_i - ligand_2]}$$

**Équation 18 : proportion de complexe Ln<sub>A</sub>-ligand<sub>1</sub> avec α le facteur de normalisation par rapport au complexe conduisant au signal le moins intense.**

Dans notre étude, le facteur de normalisation α est égal à 0,33 et est appliqué aux concentrations des complexes de DTPA, qui possèdent le rendement d'ionisation le plus élevé. Le Tableau 40 présente les proportions des espèces obtenues par HILIC ESI-MS à partir de l'Équation 18 pour les différents niveaux de concentration et la Figure 68 les diagrammes de répartition associés :

concentrations mol.L <sup>-1</sup> en lanthanide total	proportion (%)						
	1.10 <sup>-4</sup>	1,5.10 <sup>-4</sup>	2.10 <sup>-4</sup>	3.10 <sup>-4</sup>	4.10 <sup>-4</sup>	moyenne	écart-type
Complexes	ESI-MS	ESI-MS	ESI-MS	ESI-MS	ESI-MS	ESI-MS	ESI-MS
Sm-DTPA	17	16	16	16	16	16	2
Nd-DTPA	16	15	14	14	13	14	8
Sm-EDTA	33	34	34	34	34	34	1
Nd-EDTA	34	35	36	36	37	36	3

**Tableau 40 : proportions corrigées de complexes analysés par HILIC ESI-MS par niveau de concentration et proportions moyennes avec l'incertitude**



**Figure 68 : diagramme de répartition des complexes de lanthanides selon le niveau de concentration avec correction du rendement d'ionisation.**

Comme indiqué en Figure 68, la correction du rendement d'ionisation dans le calcul de la distribution par ESI-MS permet d'obtenir des répartitions des complexes de lanthanides en HILIC ESI-MS compatibles avec celles obtenues par HILIC ICP-MS et avec celles obtenues par les calculs théoriques. Les deux seules études décrivant des méthodes de quantification par HILIC ESI-MS des complexes de lanthanides et de métaux concernaient une seule espèce à chaque fois, à savoir le Gd-DTPA ou le Gd-BT-D03A (annexe 1) pour les lanthanides et le Fe-EDTA pour les métaux [97,117].

Le Tableau 41 résume les données de distribution moyenne des complexes de lanthanides obtenues par HILIC ESI-MS (corrigées), HILIC ICP-MS ainsi que l'écart-type associé. La distribution théorique issue des simulations y est également reportée.

Complexes	distribution moyenne (%)				Théorique
	ESI-MS	écart-type	ICP-MS	écart-type	
Sm-DTPA	16	2	19	2	20
Nd-DTPA	14	8	17	4	15
Sm-EDTA	34	1	31	1	30
Nd-EDTA	36	3	33	2	35

**Tableau 41 : distribution moyenne des complexes de lanthanides par HILIC ESI-MS, HILIC ICP-MS ainsi que l'écart-type associé. Distribution théorique issue des simulations par le logiciel PhreeqC**

*La distribution des complexes de lanthanides a été déterminée par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS. Afin de pouvoir valider les résultats obtenus avec chaque instrument, la répartition théorique de l'échantillon test a été simulée à l'aide du logiciel PhreeqC. Cela a permis de montrer que la séparation obtenue en ICP-MS est en accord avec la simulation alors que celle en ESI-MS avait un écart de 50 % avec celle-ci. L'hypothèse selon laquelle les rendements d'ionisation des complexes de lanthanides sont égaux en ESI-MS n'est donc pas valide. Afin de confirmer ce résultat, une étude de la réponse des complexes par ESI-MS a montré que les complexes de lanthanides n'ont pas le même rendement d'ionisation. Pour une même concentration, les signaux correspondant aux complexes de DTPA sont trois fois plus intenses que ceux des complexes d'EDTA. La prise en compte de cette différence d'ionisation dans le calcul des proportions par ESI-MS a permis d'obtenir une distribution des complexes de lanthanides compatibles avec celles obtenues par HILIC ICP-MS et celles obtenues par les calculs théoriques avec des écarts de l'ordre de 10 %.*

## **4 Conclusion**

Le couplage simultané de l'HILIC à l'ESI-MS et à l'ICP-MS a été mis au point en tenant compte des contraintes spécifiques de chaque spectromètre de masse et des longueurs de tubulures amenant la phase mobile vers chaque instrument. Le dispositif de couplage est composé d'une connectique en T sans volume pour scinder le flux chromatographique vers les deux instruments. L'objectif de ce développement est de caractériser et de quantifier les complexes de lanthanides de manière simultanée par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS, c'est-à-dire d'analyser la spéciation des lanthanides. Ce dispositif instrumental permet de ne pas modifier les performances analytiques de séparation comparativement à celles obtenues au chapitre précédent.

Des premiers essais de quantification des complexes de lanthanides simultanément par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS ont été réalisés. L'ESI-MS permet de caractériser et de quantifier directement les complexes préalablement séparés tandis que l'ICP-MS ne

permet qu'une caractérisation et qu'une quantification par l'intermédiaire des isotopes des lanthanides contenus dans les complexes. Ainsi, les spectromètres ESI-MS et ICP-MS permettent d'obtenir des informations complémentaires.

La linéarité, la répétabilité ainsi que la justesse par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS ont été évaluées. La linéarité des droites d'étalonnage par ESI-MS et ICP-MS a été validée par tests statistiques pour l'ensemble du domaine de quantification étudié soit de  $2.10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> à  $4.10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> ou d'environ 3 ppm à 60 ppm en lanthanide total. La répétabilité de la mesure est inférieure à 4 % pour l'ESI-MS et de l'ordre de 1 % pour l'ICP-MS. La justesse est respectivement de l'ordre de 10 % et de l'ordre de 1 % en ESI-MS et en ICP-MS. Les LOD des complexes de lanthanides par ICP-MS ont été déterminées et sont de l'ordre de 10 ppt soit environ  $1.10^{-10}$  mol.L<sup>-1</sup>.

La répartition des complexes dans l'échantillon a pu être déterminée avec les données obtenues en ESI-MS et en ICP-MS. Les données obtenues ont montré que la répartition mesurée par ICP-MS est en accord avec celle obtenue théoriquement avec un écart de l'ordre de 5% tandis que celle en ESI-MS, l'écart est de 50 %. La prise en compte du rendement d'ionisation dans le calcul de la distribution par ESI-MS a permis d'obtenir une répartition compatible avec celles obtenues d'une part par HILIC ICP-MS et d'autre part par les calculs théoriques. L'écart entre la distribution théorique et celle obtenue par HILIC ESI-MS est maintenant de l'ordre de 10 %.

Dans ce chapitre les développements préliminaires d'une méthode d'analyse de spéciation des lanthanides dans un système modèle ont été réalisés par couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC à l'ESI-MS et l'ICP-MS. Le système modèle est composé de complexes de lanthanides à ligands EDTA et DTPA, représentatifs des espèces présentes dans les phases aqueuses de désextraction des procédés de traitement du combustible usé. L'application de cette méthode d'analyse peut également être étendue à l'analyse de spéciation des lanthanides dans diverses matrices, comme par exemple les matrices environnementales ou biologiques. Afin d'améliorer les performances analytiques en termes de répétabilité et de justesse de la mesure par ESI-MS et par ICP-MS, une méthode de quantification par dilution isotopique sera mise en œuvre ultérieurement. Le développement de cette méthode de quantification sera fondé sur l'utilisation de traceurs enrichis isotopiquement d'éléments dans le cadre de la dilution isotopique non spécifique ou d'espèces chimiques dans le cadre de la dilution isotopique spécifique.

## **Conclusion générale et perspectives**

Les travaux de thèse ont permis la mise au point d'un premier dispositif instrumental opérationnel pour l'analyse de spéciation exhaustive de lanthanides en phases aqueuses représentatives des phases de désextraction des procédés de traitement du combustible usé. Le travail fondamental permettra, à terme, d'accéder à la caractérisation fine des performances des procédés, indispensable à leur optimisation et à leur dimensionnement. Par ailleurs, ces informations permettront l'amélioration de la compréhension des phénomènes et des mécanismes fondamentaux régissant ces procédés. La stratégie adoptée a été la mise au point d'une méthode de séparation par chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) couplée simultanément à la spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et la spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS).

L'étude bibliographique a permis de mettre en évidence que dans la famille des lanthanides, seuls les complexes de gadolinium à ligands polyaminocarboxyliques ont fait l'objet de développements analytiques pour le suivi et l'étude de spéciation d'agents de contraste. L'utilisation du mode HILIC pour ces études est relativement récente. Dans ce cadre, les phases stationnaires à fonctions zwitterionique sont très majoritairement utilisées pour le suivi et la quantification de ces agents de contraste, principalement par HILIC ICP-MS. De plus, le couplage simultané d'une séparation chromatographique avec l'ICP-MS et l'ESI-MS pour l'analyse de spéciation est peu décrit dans la littérature et a essentiellement été appliqué à l'étude de la spéciation de l'arsenic et du sélénium.

De cet état de l'art, il est ressorti qu'aucune étude ne traitait de la séparation en mode HILIC de différents complexes contenant plusieurs lanthanides, ni du développement d'un couplage simultané d'une technique chromatographique avec l'ICP-MS et l'ESI-MS pour l'analyse de spéciation des lanthanides. Ce développement a par conséquent fait l'objet de ce travail et s'est articulé autour de trois axes principaux.

- La séparation des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er), étape essentielle à ce développement, a été mise au point en mode isocratique par HILIC ESI-MS. Cette séparation, qui n'avait jamais été décrite dans la littérature, a nécessité de nombreuses optimisations. En effet, différentes phases stationnaires polaires contenant des fonctions amide, cyano, zwitterionique et diol réticulés ont été testées, parmi lesquelles seules les phases stationnaires à fonctions amide ont permis de séparer les complexes de lanthanides en mode isocratique. L'influence du pourcentage d'acétonitrile et de la concentration en sels dans la phase mobile a été étudiée ce qui a

permis d'apporter des éléments de compréhension au mécanisme de rétention des complexes Ln-DTPA et Ln-EDTA (Nd, Eu, Gd, Er) en mode HILIC. L'étude de ce mécanisme de rétention avec la phase stationnaire à fonctions amide la plus performante (colonne XBridge ; 150 x 2,1 mm ; 3,5  $\mu\text{m}$ ) a montré que les interactions électrostatiques entre les analytes et la phase stationnaire ont peu d'influence sur leur rétention. De plus, le mécanisme d'adsorption semble prédominant pour des pourcentages d'acétonitrile supérieurs à 55%.

Dans les mêmes conditions de phases mobiles, des conditions d'analyse plus rapides ont été entreprises avec une colonne plus courte et de granulométrie sub-2  $\mu\text{m}$  (Acquity ; 100 x 2,1 mm ; 1,7  $\mu\text{m}$ ). Ces conditions ont permis une réduction du temps d'analyse d'un facteur 2,5 et de 25 % de la consommation de solvant, paramètres importants en vue de l'analyse future d'échantillons radioactifs. De plus, la résolution et l'efficacité de la séparation ont été améliorées d'un facteur 1,3 et 1,9 respectivement dans ces conditions de séparation.

La caractérisation structurale par ESI-MS/MS des complexes de lanthanides a confirmé une stœchiométrie 1 : 1.

- La mise au point d'une première méthode de quantification par HILIC ESI-MS a été effectuée par étalonnage externe et les performances analytiques déterminées. Le système d'étude est composé de complexes de samarium et de néodyme à ligands EDTA et DTPA. Les limites de quantification (LOQ) des complexes Nd-DTPA et Sm-DTPA sont de l'ordre de  $1.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ , pour les complexes Sm-EDTA de l'ordre de  $6.10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$  et pour les complexes Nd-EDTA, de l'ordre de  $1,7 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . Les domaines de linéarité de la réponse s'étendent sur 1,5 ordre de grandeurs à partir de  $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . La justesse et la stabilité de la mesure sont inférieures à 5 %. Le potentiel d'utilisation de l'ESI-MS pour la caractérisation isotopique a également été évalué avec le complexe Sm-DTPA. L'objectif était de déterminer les limites instrumentales de l'ESI-MS pour ce type d'analyse en vue du développement des méthodes de quantification de type dilution isotopique. Les données préliminaires obtenues par HILIC ESI-MS sont à notre connaissance les premières obtenues sur la caractérisation isotopique des complexes de lanthanides. La justesse des mesures isotopiques par HILIC ESI-MS est de l'ordre de 2 %.
- Le développement du couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC avec l'ESI-MS et l'ICP-MS pour l'analyse de spéciation des lanthanides a été réalisé. Le rapport de flux (98,3 : 1,7 ESI-MS : ICP-MS) a été obtenu par l'optimisation conjointe des



paramètres instrumentaux et d'acquisition de chaque spectromètre de masse afin d'obtenir les conditions optimales de détection des complexes de lanthanides. Malgré la faible proportion de solvant organique introduit dans la source ICP-MS, des précautions comme l'ajout d'oxygène dans le gaz de nébulisation, l'utilisation de cônes en platine et le refroidissement de la chambre à 2°C par effet Peltier ont été prises dans le cadre de futures analyses avec une composition en solvant organique plus importante.

Une première méthode de quantification des complexes de lanthanides, simultanée par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS a ensuite été développée par étalonnage externe et les performances analytiques associés ont été déterminées. La répétabilité de la mesure pour l'ESI-MS et l'ICP-MS est respectivement inférieure à 4 % et 2 %. La justesse de la mesure est de l'ordre du % en ICP-MS tandis que celle en ESI-MS est inférieure à 7%. La distribution quantitative des espèces a été déterminée avec les données obtenues avec les deux spectromètres de masse. Les données par HILIC ESI-MS ont été calculées en tenant compte du rendement d'ionisation des complexes de lanthanides. Ainsi les proportions moyennes des complexes Sm-DTPA, Sm-EDTA, Nd-DTPA et Nd-EDTA obtenues par HILIC ESI-MS et par HILIC ICP-MS sont comparables et respectivement de l'ordre de 19 %, 31%, 17% et 33 %. Les résultats obtenus sont en adéquation avec les données théoriques calculées à l'aide du logiciel PhreeqC.

Ainsi une méthode d'analyse de spéciation des lanthanides a été développée par couplage simultané de la chromatographie en mode HILIC aux spectrométries de masse ESI-MS et ICP-MS. Cette méthodologie a été appliquée pour la séparation, la caractérisation, la quantification des complexes de lanthanides représentatifs de ceux des phases de désextraction des procédés du combustible usé. Cette méthode d'analyse peut être étendue à l'étude de la spéciation des lanthanides dans diverses matrices, comme, par exemple, les matrices environnementales et biologiques.

Les perspectives de ces travaux concernent diverses voies d'amélioration et d'approfondissement des développements réalisés au cours de cette thèse.

- Dans le but de réduire le temps d'analyse et de diminuer les volumes d'échantillons radioactifs et d'effluents, la réduction du diamètre de la colonne à particules sub-2 µm est une option envisageable. À cette fin, l'étude avec la colonne à fonctions amide Acquity de diamètre plus faible (100 x 1 mm ; 1,7 µm) est en cours. Une diminution supplémentaire de la consommation de solvant d'un facteur 4 est attendue.

De plus cette phase stationnaire à fonctions amide à particules sub-2  $\mu\text{m}$  est disponible en format capillaire et fera également l'objet de futures études. Une phase stationnaire fonctions amide à particules superficiellement poreuse sera également étudiée. Par ailleurs, le développement de microsystème séparatif de type lab-on-ship a été initié dans le cadre d'un stage post-doctoral en collaboration avec le laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation (LSABM) de l'école supérieure de physique et de chimie industrielles de la ville de Paris (ESPCI ParisTech) dans le cadre d'un stage post doctoral. Pour cela, la phase stationnaire monolithique à fonctions amide peut être tout d'abord synthétisée en capillaire, puis être intégrée dans les canaux d'une puce séparative.

- Les performances analytiques de la méthode de quantification par étalonnage externe par HILIC ESI-MS peuvent être améliorées grâce à l'utilisation d'étalons internes de complexes de lanthanides plus stables, les complexes Ln-EDTA et Ln-DTPA modifiant la répartition des espèces en solution à pH 3,2. L'objectif est d'améliorer la répétabilité et la justesse des mesures par HILIC ESI-MS. Ces composés étant très peu disponibles commercialement, leur synthèse est nécessaire. Des ligands polyaminocarboxyliques cycliques peuvent notamment être utilisés en raison de la stabilité plus importante des complexes qu'ils forment avec les lanthanides, comparés à ceux de DTPA et d'EDTA. En revanche ces complexes étant de structure différente, le rendement d'ionisation de chaque espèce devra être pris en compte.

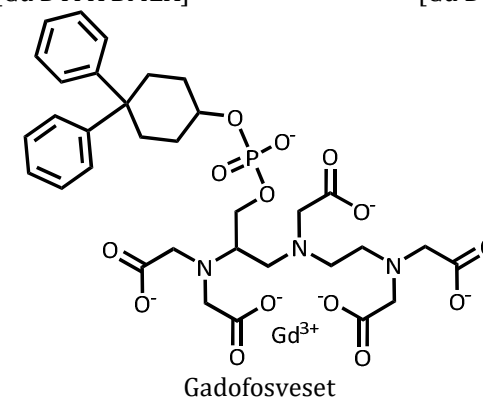
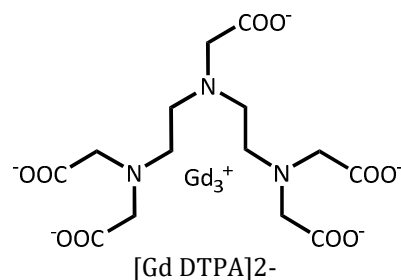
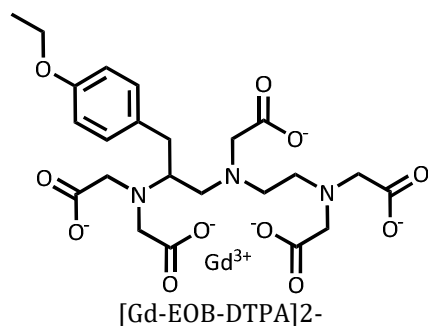
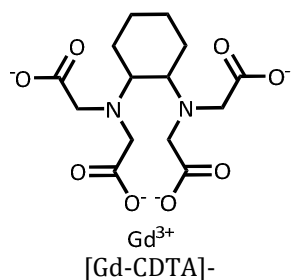
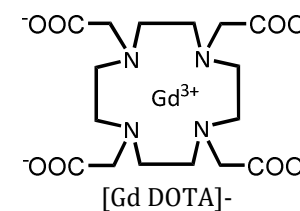
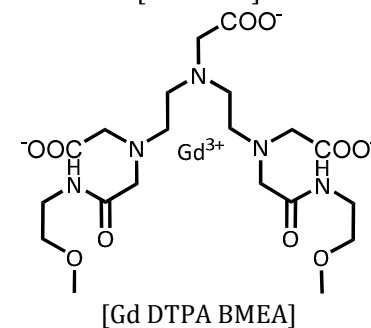
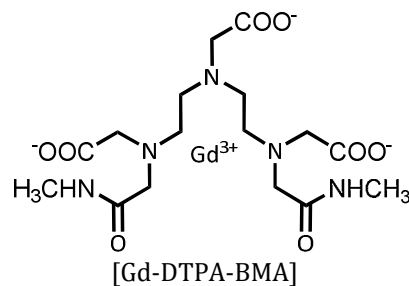
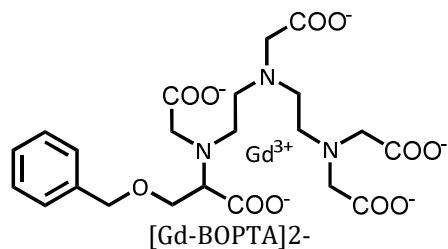
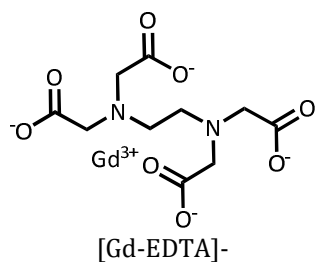
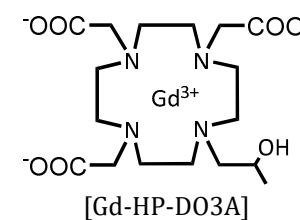
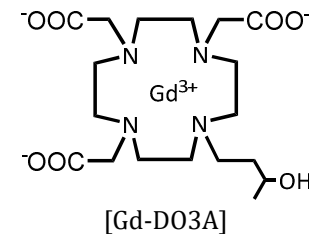
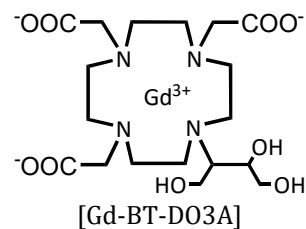
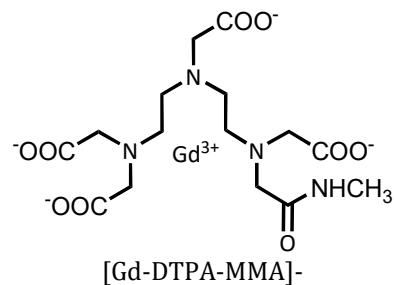
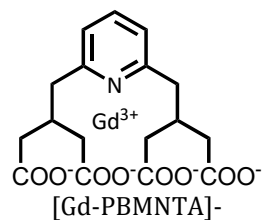
- Une voie d'amélioration des performances de la méthode de quantification simultanée par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS est le développement d'une méthode de quantification par dilution isotopique. Des résultats plus justes et plus précis pourront être obtenus. Deux types d'approches peuvent être mises en place : la dilution isotopique non spécifique par ajout d'un traceur de l'élément d'intérêt post-séparation chromatographique et la dilution isotopique spécifique par ajout de traceurs pour chaque espèce à quantifier avant la séparation chromatographique. Dans tous les cas, la synthèse et la caractérisation des traceurs, enrichis isotopiquement, de complexes de lanthanides à ligands polyaminocarboxyliques sera à envisager.

- Le dispositif instrumental composés de chaînes chromatographiques et de spectromètres de masse ESI-MS et ICP-MS est en cours d'installation en zone contrôlée pour permettre l'analyse d'échantillons radioactifs réels. Ceci implique un certain nombre de contraintes, en particulier l'utilisation d'équipements nucléarisés, c'est-à-

dire l'implantation en boîte à gants des systèmes analytiques. À cette fin, un spectromètre de masse ESI-MS LTQ (double trappe ionique linéaire) et les chaînes chromatographiques associées ont été installés en boîtes à gants. Cette installation a fait l'objet d'une partie de mes travaux de thèse. L'ensemble de ces instruments a été placé à proximité d'un ICP-MS multicollecteur nucléarisé. L'objectif est la mise au point du couplage simultané de la séparation chromatographique avec les instruments nucléarisés en tenant compte des contraintes imposées par les boîtes à gants. Une méthode d'analyse de spéciation des radioéléments sera ensuite développée en réajustant les étapes d'optimisation instrumentales et méthodologiques mises au point en laboratoire conventionnel.

## **Annexes**

## Annexe 1 : structures des agents de contraste à base de gadolinium



## Annexe 2 : modes de séparation chromatographiques

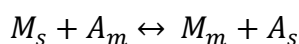
### 1. La chromatographie de partage

La chromatographie de partage est fondée sur la différence de solubilité des analytes dans la phase mobile et sur les interactions entre la phase stationnaire et les analytes. La chromatographie de partage peut être séparée en deux modes chromatographiques, la chromatographie de partage en phase normale et la chromatographie de partage en phase inverse.

#### ➤ Chromatographie de partage en phase normale (NP-HPLC)

Ce mode chromatographique met en œuvre une phase stationnaire plus polaire que la phase mobile. La phase stationnaire est généralement de type silice vierge ou fonctionnalisée par des groupements polaires de type aminopropyle ou cyanopropyle. La phase mobile est composée majoritairement d'un solvant apolaire de force éluante nulle comme l'hexane ou le chloroforme et d'une faible quantité de solvant polaire comme l'éthanol. Ce mode de séparation est adapté à la séparation de composés polaires miscibles dans des phases mobiles entièrement constituées de solvants organiques.

Le mécanisme de séparation de la NP-HPLC repose sur une solvation des groupements fonctionnels de la phase stationnaire par le solvant polaire présent en faible quantité dans la phase mobile. Les analytes polaires peuvent ainsi, soit interagir avec les fonctions de la phase stationnaire, soit déplacer une molécule de solvant adsorbée à la surface. Une compétition entre les analytes et les molécules de solvant adsorbées à la surface de la phase stationnaire se produit.



avec M, la molécule de solvant et A l'analyte. Les indices s et m correspondent respectivement à l'espèce en phase stationnaire et en phase mobile.

La variation du pourcentage de solvant polaire dans la phase mobile va donc modifier l'équilibre de distribution des analytes entre la phase stationnaire et la phase mobile. Une augmentation de la proportion de solvant polaire va diminuer la rétention des analytes polaires, tandis qu'une diminution du pourcentage de solvant polaire va favoriser les interactions entre la phase stationnaire et les analytes polaires, augmentant leur rétention.

Ainsi la rétention des composés polaires peut être décrite par l'équation simplifiée suivante, analogue à celle décrivant la rétention en chromatographie d'adsorption [24]:

$$\log k = \log k_B - n \cdot \log \% S_0$$

avec  $k$  le facteur de rétention de l'analyte ;  $k_B$  le facteur de rétention du composé extrapolé pour une phase mobile purement composé de solvant organique ;  $n$  le coefficient stœchiométrique correspondant au nombre de molécules de solvant organique nécessaire pour déplacer un analyte adsorbé à la surface de la phase stationnaire ;  $\% S_0$  le pourcentage de solvant organique.

### ➤ **Chromatographie de partage en phase inverse (RP-HPLC)**

Contrairement à la NP-HPLC, la RP-HPLC est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire apolaire et hydrophobe de type silice vierge fonctionnalisée par des chaînes alkyles  $C_8$  ou  $C_{18}$ . La phase mobile, quant à elle, est majoritairement composée d'eau avec une faible quantité de solvant organique de type acétonitrile ou méthanol. Ce mode de séparation est adapté à la séparation de composés polaires et hydrophobes.

Le mécanisme de séparation en RP-HPLC repose sur le partage de l'analyte entre la phase stationnaire et la phase mobile. Des interactions hydrophobes entre les analytes et la phase stationnaire sont engendrées par les groupements apolaires à la surface de la phase stationnaire. Une compétition de l'analyte entre la phase stationnaire et la phase mobile se produit selon l'hydrophobie de chacune de ces phases. Lorsque la phase mobile est majoritairement composée d'eau, les composés apolaires et hydrophobes sont retenus par la phase stationnaire. Lorsque la force éluante de la phase mobile augmente, à savoir le pourcentage de solvant organique, les composés vont être élués par ordre d'hydrophobie croissante. Ainsi l'ordre d'élution des composés en RP-HPLC est inversé par rapport à celui en NP-HPLC.

La rétention des composés hydrophobes peut être décrite par l'équation suivante, basée sur les phénomènes de partage [24] :

$$\log k = \log k_A - S \cdot \% H_2O$$

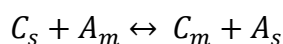
avec  $k$  le facteur de rétention de l'analyte ;  $k_A$  le facteur de rétention hypothétique du composé si la phase mobile est purement organique ;  $S$  une constante prenant en compte la polarité du solvant et la taille de l'analyte.

## **2. La chromatographie d'échange d'ions (IC-HPLC)**

La chromatographie d'échange d'ions (IC-HPLC) repose sur l'utilisation de phases stationnaires échangeuses d'ions. Ces phases stationnaires sont composées de fonctions ionisées greffées sur le support de la phase stationnaire, de charge négative ou positive

et d'ions mobiles appelé contre-ions, de signe opposé à celui des fonctions de la phase stationnaire. Les contre-ions assurent l'électroneutralité de la phase stationnaire. Ces phases stationnaires sont classées en deux groupes : les échangeurs de cations constitués de groupements chargés négativement généralement de type sulfonate ; les échangeurs d'anions constitués de groupements chargés positivement généralement de type amine quaternaire. La phase mobile est composée d'eau dans laquelle des sels sont ajoutés. Ce mode de séparation est adapté à la séparation de composés ionisés et ionisables.

Le mécanisme de rétention est basé sur l'échange entre le contre-ion et l'analyte chargé au niveau des groupements fonctionnels de la phase stationnaire. La rétention des analytes chargés en IC-HPLC au niveau de la phase stationnaire est régie par l'équilibre suivant :



avec C, le contre-ion échangé par la phase stationnaire et A l'analyte. Les indices s et m correspondent respectivement à l'espèce en phase stationnaire et en phase mobile.

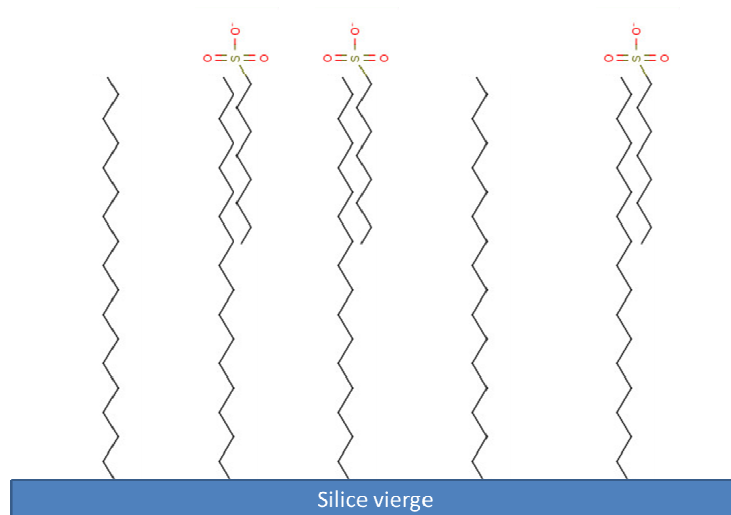
L'affinité des analytes pour la phase stationnaire est la principale caractéristique permettant d'induire la séparation des composés. Un composé de densité de charge élevée est plus retenu qu'un composé de faible densité en raison des interactions coulombiennes plus fortes entre les groupements ionisés de la phase stationnaire et l'analyte. Par ailleurs, un ion de petite taille est plus retenu qu'un ion de grande taille en raison des gênes stériques pour atteindre les fonctions de la phase stationnaire. La composition permet de modifier l'équilibre entre l'analyte et le contre-ion, influençant la rétention de l'analyte. L'augmentation de la concentration en contre-ion dans la phase mobile va déplacer l'équilibre et induire une diminution de la rétention des analytes. Le pH de la phase mobile a une influence également sur la rétention des analytes puisqu'il détermine l'état de charge d'un composé.

### **3. La chromatographie d'appariement d'ions (IP-HPLC)**

Une paire d'ions est une espèce chimique formée par l'association de deux ions de charges opposées. La chromatographie d'appariement d'ions (IP-HPLC) est basée sur la formation de cette espèce chimique entre l'analyte et un tensio-actif. L'IP-HPLC repose sur l'utilisation de phases stationnaires hydrophobes de type silice vierge fonctionnalisées par des chaînes alkyles en C<sub>18</sub> ou C<sub>8</sub>. La phase mobile est composée majoritairement d'eau avec une faible quantité de solvant organique dans laquelle un tensio-actif est ajouté. Les tensio-actifs communément utilisés sont les alkylsulfates



comme octadécylsulfate (ODS) pour les tensio-actifs à charge négative et les amines quaternaires comme le tétrabutylamonium (TBA) pour les tensio-actifs à charge positive. Le tensio-actif va modifier dynamiquement la phase stationnaire en s'adsorbant à sa surface.



#### **Silice fonctionnalisée par des groupements octadécyle modifiée par de l'octylsulfate**

Ce mode de séparation est adapté à la séparation des composés ioniques peu polaires.

Le mécanisme de l'IP-HPLC est plus complexe que les chromatographies NP-HPLC, RP-HPLC ou IC-HPLC et la rétention des analytes dépend de plusieurs facteurs. La rétention de l'analyte va être influencée par les interactions coulombiennes entre les composés et le tensio-actif. Un mécanisme de partage est également présent entre la phase mobile et la phase stationnaire comme en RP-HPLC. De plus, un analyte peut interagir avec un tensio-actif adsorbé à la surface, augmentant la rétention de l'analyte. Ainsi, l'ordre d'élution des espèces dépendra de la charge et également de la polarité des espèces. Un analyte multichargé hydrophobe sera plus retenu qu'un monochargé moins hydrophobe.

### Annexe 3 : données chromatographiques

- Le débit optimal théorique est calculé à partir de la relation suivant :

$$D_{th} = \frac{15\pi\phi_{int}^2\varepsilon}{2d_p}$$

avec  $\phi_{int}$  le diamètre interne de la colonne (cm),  $\varepsilon$  la perméabilité de la colonne (0,6) et  $d_p$  le diamètre des particules ( $\mu\text{m}$ ).

- Le facteur de rétention  $k_i$  d'une espèce  $i$  est calculé avec la relation suivante :

$$k_i = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0}$$

avec  $t_{Ri}$  le temps de rétention de l'espèce  $i$  et  $t_0$  le temps mort de la colonne.

- Le facteur de sélectivité  $\alpha_{i,j}$  entre deux espèces  $i$  et  $j$  est calculé avec la relation suivante :

$$\alpha = \frac{k_i}{k_j} = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_{Rj} - t_0}$$

$\alpha_{i,j}$  est toujours supérieur à 1, le composé  $i$  est plus retenu que le composé  $j$ .

- La résolution  $Rs_{i,j}$  entre deux espèces  $i$  et  $j$  est calculée avec la relation suivante :

$$Rs_{i,j} = 2 \frac{t_{Ri} - t_{Rj}}{\omega_i + \omega_j}$$

avec  $\omega$  la largeur à 13,4 % de la hauteur du pic chromatographique de l'espèce associée.

- Les pics chromatographiques obtenus dans notre étude n'étant pas symétriques, le nombre de plateau théorique  $N_i$  associé au pic chromatographique de l'espèce  $i$  a été calculé à partir de la relation suivante proposée par Foley et Dorsey [179] :

$$N_i = \frac{41,7\left(\frac{t_{Ri}}{w_i}\right)^2}{1,25 + \frac{B}{A}}$$

avec  $w_i$  la largeur à 10% du pic chromatographique de l'espèce  $i$ ,  $B$  l'asymétrie à droite de l'apex du pic chromatographique de l'espèce  $i$  à 10 % de la hauteur de ce pic chromatographique et  $A$  l'asymétrie à gauche de l'apex du pic chromatographique de l'espèce  $i$  à 10 % de la hauteur de ce pic chromatographique.

Cette relation est valable pour des valeurs de  $B/A$  comprises entre 1 et 2,76 et entre 2,77 et 4.

- La limite de détection en ICP-MS est calculée avec la relation suivante [63] :

$$LOD_{ICP-MS} = \frac{3\sigma_{blanc}}{b}$$

avec  $\sigma_{blanc}$  l'écart-type sur l'intensité du signal sans analyte (blanc) et b la pente de la droite d'étalonnage de l'analyte.

## **Annexe 4 : matériels et méthodes**

### **1. Réactifs**

Le DTPA ( $C_{14}H_{23}N_3O_{10}$ ,  $M = 393,35 \text{ g.mol}^{-1}$  pureté  $\geq 98 \%$ ), l'EDTA tétrasodé, dihydraté ( $C_{10}H_{12}N_2O_8Na_4, 2H_2O$ ,  $M = 416,25 \text{ g.mol}^{-1}$ , pureté  $\geq 99,5\%$ ) et le toluène ( $C_7H_8$ ,  $M = 92,13 \text{ g.mol}^{-1}$ , pureté  $\geq 99,7\%$ ) proviennent de chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'acétonitrile ( $CH_3CN$ , qualité LC-MS), l'acétate d'ammonium ( $C_2H_3O_2NH_4$ ,  $M = 77.08 \text{ g.mol}^{-1}$ , qualité Normapur) et l'acide formique ( $CHOOH$ ,  $M = 46,03 \text{ g.mol}^{-1}$ , qualité Normapur) sont fournis par VWR Prolabo (Briare le canal, France). Les solutions de lanthanides (Nd, Sm, Eu, Gd, Er), sous forme de solutions standards ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en milieu nitrique ( $HNO_3$  2% (w/w)), sont obtenues après du groupe SPEX CertiPrep (Longjumeau, France). L'eau ultrapure ( $18,2 \text{ M}\Omega\text{.cm}$ ) a été purifiée par un système milliQ (millipore, Guyancourt, France).

### **2. Solutions mères et préparations d'échantillons**

Les solutions mères de DTPA et d'EDTA à  $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  sont préparées par dissolution de la quantité adéquate de ligand dans l'eau ultrapure. Les solutions mères de lanthanides (Nd, Sm, Eu, Gd, Er) à  $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  sont obtenues par dilution de chaque solution standard dans l'eau ultrapure. Les échantillons sont préparés en mélangeant le volume adéquat de solutions mères de ligands et de lanthanides pour atteindre les proportions lanthanides:ligands souhaitées. Le pH est alors ajusté à pH 3,2 avec de l'ammoniac concentré. Les échantillons à analyser sont enfin dilués dans les différentes phases mobiles pour atteindre les concentrations souhaitées.

### **3. Phases mobiles**

Les phases mobiles sont toujours préparées en mélangeant les proportions adéquates d'acétonitrile et d'eau ultrapure (acétonitrile/eau (v/v)) pour obtenir les pourcentages de solvant et d'eau souhaités. 0,5 % (v/v) d'acide formique est ensuite ajoutée. Enfin l'acétate d'ammonium est dissous dans la phase mobile pour atteindre la concentration souhaitée. Le pH hydro-organique de la phase mobile est alors de 3,8. Un décalage de 0,5 unité pH est généralement observé entre le pH aqueux et le pH hydro-organique [180].

### **4. Instrumentation**

Spectromètre de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS)

Les analyses par ESI-MS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre triple quadripôle TSQ Quantum Ultra™ Triple Stage Quadrupole (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) équipé d'une source IonMax composée d'une sonde H-ESI II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### Spectromètre de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS)

Les analyses par ICP-MS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre quadripolaire XSERIES 2 ICP-MS (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne) équipé d'un PC3<sup>x</sup> (Elemental Scientific, ESI, Omaha, NE, USA) permettant de refroidir par effet Peltier la chambre de nébulisation.

#### Chaîne chromatographique

Les analyses par chromatographie ont été réalisées avec un système DIONEX Ultimate 3000 UHPLC<sup>+</sup> *focused* composé d'un dégazeur, d'une double pompe RS, d'un passeur d'échantillons RS, d'un compartiment colonne thermostaté RS. Durant les expériences, les échantillons sont gardés à une température de 22 °C et la colonne chromatographique également.

### **5. Conditions d'analyse**

#### **5.1 Conditions instrumentales**

##### **➤ Conditions d'analyse par ESI-MS en injection directe :**

Lors des expériences par ESI-MS en injection directe (chapitres IV et V), un pousse seringue (Harvard Apparatus Cambridge, Holliston, MA, USA) a permis de délivrer, à un débit de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , les échantillons contenus dans une seringue en verre de 500  $\mu\text{L}$  (Hamilton Co, Reno, USA). Les échantillons ont été analysés en mode d'ionisation négative à -3,5 kV. La température de vaporisation est de 50 °C et celle du capillaire de transfert est de 250°C. Les gaz séchant et auxiliaire sont respectivement de 10 et 5 ua. Les offsets du tube lens et du skimmer ont été optimisés pour obtenir la meilleure sensibilité et la meilleure stabilité du signal.

Concernant les mesures isotopiques par ESI-MS en injection directe, les spectres de masse du DTPA-Sm ont été obtenus en mode profil et en mode centroïde, pour des fréquences de balayage de 0,5 s.scan<sup>-1</sup> et 0,25 s.scan<sup>-1</sup>. Le temps d'acquisition est égal à une minute.

Concernant l'obtention des spectres de fragmentation des complexes de lanthanides, ils ont été obtenus à différentes largeurs  $\Delta m$ . Pour chaque largeur  $\Delta m$ , plusieurs énergies

de fragmentation ont été testées. L'ensemble des conditions est présenté dans le tableau suivant :

Composés fragmentés	Masse sélectionnée (m/z)	$\Delta m$	Énergies de fragmentation (eV)
[Sm-DTPA+H] <sup>-</sup>	538	5 ; 10	16, 19, 21, 23
[Nd-DTPA+H] <sup>-</sup>	535	5 ; 10	16, 19, 22, 24
[Sm-EDTA] <sup>-</sup>	437	5 ; 10	11, 13, 16, 19, 21
[Nd-EDTA] <sup>-</sup>	434	5 ; 10	12, 14, 17, 19, 21

Le temps d'acquisition des spectres de masse est 0,5 minute. Pour la concentration des échantillons : se reporter à la partie 5.2.

➤ **Conditions d'analyse par HILIC ESI-MS :**

Lors des expériences en couplage HILIC ESI-MS (chapitres III, IV et V), les échantillons ont été analysés en mode d'ionisation négative à une tension de -4kV. La température de vaporisation a été optimisée à 400°C et celle du capillaire de transfert à 250°C. Pour chaque composition de phase mobile, le débit des gaz ainsi que les offsets du tube lens et du skimmer ont été optimisés pour obtenir la meilleure sensibilité et la meilleure stabilité du signal. Les valeurs des gaz séchant et auxiliaire sont précisés au cours des chapitres. La gamme de masse balayée en mode fullscan est de  $m/z$  200-600. Pour la concentration des échantillons : se reporter à la partie 5.2.

➤ **Conditions d'analyse par ICP-MS :**

Lors des expériences de détermination du rendement de la colonne Xbridge (chapitre III), les échantillons ont été analysés à l'aide du passeur automatique d'échantillons. Les paramètres ICP-MS sont présentés dans le tableau suivant :

ICP-MS	
puissance	1400 W
injecteur	2 mm
gaz plasmagène	13 L.min <sup>-1</sup>
gaz auxiliaire	0,9 L.min <sup>-1</sup>
gaz de nébulisation	0,9 L.min <sup>-1</sup>
chambre de nébulisation	PC <sup>3x</sup>
température	2°C
oxygène	4 mL.min <sup>-1</sup>
cônes	platine

Lors des expériences de sensibilité en ICP-MS (chapitre V), un pousse seringue (Harvard Apparatus Cambridge, Holliston, USA) a permis de délivrer, à un débit de 145,1

$\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , les échantillons contenus dans une seringue de 12 mL (HSW, Tuttlingen, Allemagne). Les paramètres ICP-MS sont présentés dans le tableau suivant :

ICP-MS	
puissance	1400 W
injecteur	2 mm
gaz plasmagène	14 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
gaz auxiliaire	0,92 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
gaz de nébulisation	1,04 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
chambre de nébulisation température	PC <sup>3x</sup> 2°C
oxygène	4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
cônes	platine

➤ **Conditions d'analyse par couplage de l'HILIC à l'ESI-MS et à l'ICP-MS°:**

Le flux chromatographique est scindé en deux par une connectique en T à faible volume mort P-890 (Upchurch Scientific®, CM Scientific Ltd., Silsden, Royaume Uni). Le tube dirigeant le flux vers l'ESI-MS est un tube en PEEK d'une longueur de 1,5 m et d'un diamètre interne de 125  $\mu\text{m}$  (Upchurch Scientific®, CM Scientific Ltd., Silsden, Royaume Uni). Le tube dirigeant le flux vers l'ICP-MS est un tube en PEEK d'une longueur de 4,6 m et d'un diamètre interne de 65  $\mu\text{m}$  (Upchurch Scientific®, CM Scientific Ltd., Silsden, Royaume Uni). Ce tube est lié à une chambre de mélange à faible volume (950 nL) Micro Static Mixing Tee M-540 (Upchurch Scientific®, CM Scientific Ltd., Silsden, Royaume Uni). L'autre partie de cette connectique est reliée à un tube en PEEK de 125  $\mu\text{m}$  de diamètre interne permettant de délivrer un débit d'appoint en acide nitrique 2% (w/w) à 140  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  à l'aide d'un pousse seringue (Harvard Apparatus Cambridge, Holliston, USA). Une seringue de 60 mL (CODAN, Lensahn, Allemagne) est utilisée pour contenir l'acide nitrique 2% (w/w). Le mélangeur est relié à la chambre de nébulisation de l'ICP-MS par l'intermédiaire d'un tube en PEEK de 5 cm de longueur et de diamètre interne de 250  $\mu\text{m}$ .

Les conditions instrumentales de l'ESI-MS et de l'ICP-MS sont décrites dans le tableau suivant :

Paramètres			
ESI-MS		ICP-MS	
Mode d'acquisition	fullscan	puissance	1400 W
Tension de spray	- 4 kV	injecteur	2 mm
Gaz séchant	35 ua	gaz plasmagène	14 L.min <sup>-1</sup>
Gaz auxiliaire	30 ua	gaz auxiliaire	0,89 L.min <sup>-1</sup>
Température de vaporisation	400°C	gaz de nébulisation	1,04 L.min <sup>-1</sup>
Température du capillaire de transfert	270°C	chambre de nébulisation température	PC <sup>3x</sup> 2°C
		oxygène	4 mL.min <sup>-1</sup>
		cônes	platine

## 5.2 Conditions chromatographiques

### ➤ Étude de la sélectivité des phases stationnaires à groupements polaires (chapitre III)

Les phases stationnaires suivantes ont été testées : Inertsil® cyano CN-3 (150 x 3 mm ; 3 µm, GL Sciences, Japon), ZIC®-HILIC (150 x 2,1mm ; 5 µm, Sequant™, Allemagne), Luna HILIC (150 x 3 mm ; 5 µm, Phenomenex, France), TSKgel Amide-80 (150 x 2 mm ; 3 µm, TOSOH, Japon), XBridge™ Amide (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm, Waters, Irlande).

Plusieurs compositions de phases mobiles ont été testées et sont présentées dans le tableau suivant :

Concentration d'acétate d'ammonium (mmol.L <sup>-1</sup> )	Proportion acétonitrile/eau (v/v)
5	60/40, 70/30, 80/20
20	60/40, 70/30, 80/20

Toutes les séparations ont lieu en mode isocratique. Le débit de la phase mobile pour chaque colonne est de 0,1 mL.min<sup>-1</sup>. Les échantillons sont dilués dans les différentes phases mobiles et sont composés de lanthanides (Nd, Eu, Gd, Er) à une concentration de 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>, chacun en présence de DTPA dans les proportions lanthanides:DTPA 1:1,25. Le volume d'injection est de 5 µL.

### ➤ Étude comparative des phases stationnaires à fonctions amide (chapitre III)

Les phases stationnaires suivantes ont été comparées : TSKgel Amide-80 (150 mm x 2 mm ; 3 µm, TOSOH, Japon), XBridge™ Amide (150 mm x 2,1 mm ; 3,5 µm, Waters, Irlande).



Les expériences ont été réalisées en mode isocratique avec une phase mobile 68/32 (v/v) acétonitrile/eau, 0,5 % d'acide formique avec 5, 10 et 20 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium. Le débit de la phase mobile est de 0,15 mL.min<sup>-1</sup>. Trois échantillons ont été analysés et sont présentés dans le tableau suivant :

Échantillons	Proportions	Concentration (mol.L <sup>-1</sup> )
Ln (Nd, Eu, Gd, Er) en présence de DTPA	Lanthanide:DTPA 1:1,25	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide
Ln (Nd, Eu, Gd, Er) en présence d'EDTA	Lanthanide:EDTA 1:1,25	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide
Ln (Gd,Er) en présence de DTPA et d'EDTA	Lanthanide:DTPA:EDTA 2:1,25:1,25	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide

Le volume d'injection est de 5 µL.

### ➤ Rendement de la colonne XBridge

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne XBridge™ Amide (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm, Waters, Irlande). La phase mobile est composée de 68/32 (v/v) acétonitrile/eau, 5 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de 0,15 mL.min<sup>-1</sup>. Les échantillons sont composés de gadolinium à une concentration de 10<sup>-4</sup> en présence de DTPA dans les proportions lanthanide:ligand 1:1,25. Le volume d'injection est de 5 µL.

5 échantillons ont été injectés avec la colonne XBridge et trois fractions pour chaque échantillon (avant, pendant, après le pic chromatographique du Gd-DTPA) ont été récupérées. Les fractions ont été diluées dans l'acide nitrique 2% et quantifiées par ICP-MS. Les paramètres ICP-MS sont reportés dans le tableau suivant

### ➤ Étude des mécanismes de rétention des complexes de lanthanides (chapitre III)

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne XBridge™ Amide (150 x 2,1 mm ; 3,5 µm, Waters, Irlande). Différentes compositions de phases mobiles ont été criblées et sont présentées dans le tableau suivant :

Concentration d'acétate d'ammonium (mmol.L <sup>-1</sup> )	Proportion acétonitrile/eau (v/v)
5 mmol.L <sup>-1</sup>	40-80 (tous les 5%)
10 mmol.L <sup>-1</sup>	40-80 (tous les 5%)
15 mmol.L <sup>-1</sup>	40-80 (tous les 5%)
20 mmol.L <sup>-1</sup>	40-80 (tous les 5%)

Le débit de la phase mobile est de  $0,15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . L'échantillon est dilué dans la phase mobile et est composé de lanthanides (Nd, Gd, Eu, Er) à une concentration de  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  chacun en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:1,25:1,25. Le volume d'échantillon est de  $5 \mu\text{L}$ .

➤ **Conditions d'analyse plus rapides (chapitre III)**

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne ACQUITY UPLC® BEH Amide ( $100 \times 2,1 \text{ mm}$  ;  $1.7 \mu\text{m}$ , Waters, Irlande).

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau,  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de  $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

L'échantillon est composé de lanthanides (Nd, Gd, Eu, Er) à une concentration de  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  chacun en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75. Le volume d'échantillon est de  $3 \mu\text{L}$ .

➤ **Séparation du samarium et du néodyme en présence d'EDTA et de DTPA (chapitre IV)**

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne ACQUITY UPLC® BEH Amide ( $100 \times 2,1 \text{ mm}$  ;  $1.7 \mu\text{m}$ , Waters, Irlande).

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau,  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de  $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

L'échantillon est composé de lanthanides (Sm, Nd) à une concentration de  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  chacun en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75. Le volume d'échantillon est de  $3 \mu\text{L}$ .

➤ **Étude de la méthode de quantification par étalonnage interne à pH 3,2 (chapitre IV)**

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne ACQUITY UPLC® BEH Amide ( $100 \times 2,1 \text{ mm}$  ;  $1.7 \mu\text{m}$ , Waters, Irlande).

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau,  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de  $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Dans ces expériences, plusieurs échantillons ont été analysés et sont présentés dans le tableau suivant :

Échantillons	Proportions	Concentration (mol.L <sup>-1</sup> )
Ln (Nd, Sm) en présence de DTPA et d'EDTA + Tm en présence de DTPA + Tm en présence d'EDTA	lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 + Tm:DTPA 1:1,25 +Tm:EDTA 1:1,25	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide
Ln (Nd, Sm) en présence de DTPA et d'EDTA + Tb en présence de DTPA + Tb en présence d'EDTA	lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 + Tb:DTPA 1:1,25 +Tb:EDTA 1:1,25	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide
Ln (Nd, Sm) en présence de DTPA et d'EDTA + Tm en présence de DTPA + Tb en présence d'EDTA	lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 + Tm:DTPA 1:1,25 +Tb:EDTA 1:1,25	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide
Ln (Nd, Sm) en présence de DTPA et d'EDTA + Tb en présence de DTPA	lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 + Tb:DTPA 1:1,25	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide
Ln (Nd, Sm) en présence de DTPA et d'EDTA + Tb en présence d'EDTA	lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 +Tb:EDTA 1:1,25	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide
Ln (Nd, Sm) en présence de DTPA et d'EDTA + Tb en présence de DTPA	lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 +Tb:EDTA 1:1,1	1.10 <sup>-4</sup> pour chaque lanthanide

Le volume d'injection est de 3 µL.

➤ **Étude de la méthode de quantification par étalonnage interne à pH 6,8 (chapitre IV)**

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne ACQUITY UPLC® BEH Amide (100 x 2,1 mm ; 1.7 µm, Waters, Irlande).

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, sans acide formique et a un pH hydro-organique de 6,8 avec de l'ammoniac concentré. Le débit de la phase mobile est de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.

L'échantillon est composé de lanthanides (Sm, Nd) à une concentration de 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> chacun en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75. À cet échantillon est ajouté un étalon interne de Tb en présence de DTPA dans les proportions 1 :1,25 pour une concentration de 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> en Tb dans l'échantillon. Le pH a été ajusté à pH 6,8 avec de l'ammoniac concentré. Le volume d'injection est de 3 µL.

➤ **Obtention des spectres de fragmentation par ESI-MS (chapitre IV)**

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. L'échantillon est composé d'un lanthanide (Sm ou

Nd) à une concentration de  $10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> en présence d'EDTA ou de DTPA dans les proportions lanthanide:ligand 1:1,25. Pour les conditions de l'ESI-MS : se reporter à la partie 5.1.

➤ **Limites de détection par HILIC ESI-MS (chapitre IV)**

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne ACQUITY UPLC® BEH Amide (100 x 2,1 mm ; 1.7 µm, Waters, Irlande).

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.

Dans ces expériences, les échantillons sont composés de lanthanides (Sm, Nd) en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 à différentes concentrations en lanthanide total :  $2 \cdot 10^{-9}$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $2 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $2 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Le volume d'injection est de 3 µL.

➤ **Domaines de linéarité en HILIC ESI-MS (chapitre IV)**

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne ACQUITY UPLC® BEH Amide (100 x 2,1 mm ; 1.7 µm, Waters, Irlande).

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.

Dans ces expériences, les échantillons pour déterminer le domaine de linéarité sont composés de lanthanides (Sm, Nd) en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 à différentes concentrations en lanthanide total :  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}$ ,  $2 \cdot 10^{-4}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ ,  $6 \cdot 10^{-4}$ ,  $8 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. L'échantillon de contrôle est composé de lanthanides (Sm, Nd) à une concentration de  $2 \cdot 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup> en lanthanide total en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75. Le volume d'injection est de 3 µL.

➤ **Potentialité de la mesure isotopique par ESI-MS en injection directe (chapitre IV)**

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. L'échantillon est composé de samarium à une concentration de  $10^{-4}$  en présence de DTPA dans les proportions lanthanide:ligand 1:1,25. Pour les conditions de l'ESI-MS : se reporter à la partie 5.1.

#### ➤ **Potentialité de la mesure isotopique par HILIC ESI-MS (chapitre IV)**

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. L'échantillon est composé de samarium à une concentration de 10<sup>-4</sup> en présence de DTPA dans les proportions lanthanide:ligand 1:1,25. Le volume d'injection est de 3 µL. Pour les conditions de l'ESI-MS : se reporter à la partie 5.1.

#### ➤ **Faisabilité du couplage de l'HILIC à l'ESI-MS et l'ICP-MS (chapitre V)**

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne ACQUITY UPLC® BEH Amide (100 x 2,1 mm ; 1.7 µm, Waters, Irlande).

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.

L'échantillon est composé de lanthanides (Sm, Nd) à une concentration de 1.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> chacun soit 15 ppm en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75. Le volume d'échantillon est de 3 µL.

#### ➤ **Méthode de quantification par HILIC ESI-MS et HILIC ICP-MS (chapitre V)**

La phase stationnaire utilisée pour ces expériences est la colonne ACQUITY UPLC® BEH Amide (100 x 2,1 mm ; 1.7 µm, Waters, Irlande).

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Le débit de la phase mobile est de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.

Dans ces expériences, la droite d'étalonnage est composée d'échantillons contenant des lanthanides (Sm, Nd) en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75 à différentes concentrations en lanthanide total : 2.10<sup>-5</sup>, 1.10<sup>-4</sup>, 1,5. 10<sup>-4</sup>, 2.10<sup>-4</sup>, 3.10<sup>-4</sup>, 4.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>, soit d'environ 3, 15, 22,5, 30, 45, 60 ppm. L'échantillon de contrôle est composé de lanthanides (Sm, Nd) à une concentration de 2.10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup>, soit 30 ppm en lanthanide total en présence de DTPA et d'EDTA dans les proportions lanthanide:DTPA:EDTA 2:0,75:1,75. Le volume d'injection est de 3 µL.

#### ➤ **Réponse des complexes par ESI-MS (chapitre V)**

La phase mobile est composée de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. Quatre échantillons ont été analysés et sont composés d'un lanthanide (Sm ou Nd) à une concentration de 10<sup>-4</sup> mol.L<sup>-1</sup> en présence

d'EDTA ou de DTPA dans les proportions lanthanide:ligand 1:1,25. Pour les conditions de l'ESI-MS se reporter à la partie 5.1.

➤ **Réponse des complexes par ICP-MS (chapitre V)**

La préparation des échantillons est légèrement différente dans cette expérience. Afin de reproduire les conditions d'analyse en mode couplage simultané, les échantillons ne sont pas dilués dans la phase mobile mais dans une phase composée de 97% d'acide nitrique 2 % (w/w) et de 3% de 70/30 (v/v) acétonitrile/eau, 15 mmol.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 0,5 % d'acide formique. La composition des échantillons est présentée dans le tableau suivant :

Échantillons	Proportion	Concentrations (ppb)
Sm + Nd	Pas de ligand	5 ; 30
Sm en présence de DTPA	1:1,25	1 ; 10 ; 50
Nd en présence de DTPA	1:1,25	1 ; 10 ; 50
Sm en présence d'EDTA	1:1,25	1 ; 10 ; 50
Nd en présence d'EDTA	1:1,25	1 ; 10 ; 50

Pour les conditions de l'ICP-MS se reporter à la partie 5.1.



## Références

- [1] Direction Économie Prospective et Transparence, *Bilan électrique 2014*, RTE (Réseaux de Transport d'Électricité), **2015**.
- [2] Loi N°2006-739/JO n°149, **29 juin 2006**
- [3] K.L. Nash, J.C. Braley, *Challenges for Actinide Separations in Advanced Nuclear Fuel Cycles*, In : Nuclear Energy and the Environment, ACS Symposium Series, Washington, **2010**, p. 19-38.
- [4] S. Cotton, *Introduction to the Lanthanides*, In : Lanthanide and Actinide Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd, **2006**, p. 1-7.
- [5] J.C.G. Bunzli, *Benefiting from the unique properties of lanthanide ions*. Accounts of Chemical Research 39 (1), **2006**. p. 53-61.
- [6] G.M. Kalvius, *5f-electron structure in light actinides from Mossbauer studies*. Hyperfine Interactions 26 (1-4), **1985**. p. 793-816.
- [7] H.G. Friedman, G.R. Choppin, D.G. Feuerbacher, *The shapes of the f orbitals*. Journal of Chemical Education 41 (7), **1964**. p. 354.
- [8] R.G. Haire, *Comparison of the chemical and physical-properties of f-element metals and oxides - their dependence on electronic-properties*. Journal of Alloys And Compounds 223 (2), **1995**. p. 185-196.
- [9] S. Cotton, *The Lanthanides - Principles and Energetics*, In : Lanthanide and Actinide Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd, **2006**, p. 9-22.
- [10] G.R. Choppin, E.N. Rizkalla, *Chapter 128 Solution chemistry of actinides and lanthanides*, In : Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, Elsevier, **1994**, p. 559-590.
- [11] E.N. Rizkalla, G.R. Choppin, *Chapter 127 Lanthanides and actinides hydration and hydrolysis*, In : Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, Elsevier, **1994**, p. 529-558.
- [12] S. Cotton, *Coordination Chemistry of the Lanthanides*, In : Lanthanide and Actinide Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd, **2006**, p. 35-60.
- [13] R.G. Pearson, *Hard and soft acids and bases*. Journal of the American Chemical Society 85 (22), **1963**. p. 3533-&.
- [14] S. Cotton, *Electronic and Magnetic Properties of the Lanthanides*, In : Lanthanide and Actinide Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd, **2006**, p. 61-87.
- [15] R.M. Smith, A.E. Martell, *NIST Critical Selected Stability Constants of Metal Complexes*. (2004) DATABASE 46.8
- [16] G. Anderegg, F. Arnaud-Neu, R. Delgado, J. Felcman, K. Popov, *Critical evaluation of stability constants of metal complexes of complexones for biomedical and environmental applications* Pure and Applied Chemistry 77 (8), **2005**. p. 1445-1495.
- [17] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen, R. Lobinski, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*. Pure and Applied Chemistry 72 (8), **2000**. p. 1453-1470.
- [18] R. Lobinski, *Elemental speciation and coupled techniques*. Applied Spectroscopy 51 (7), **1997**. p. A260-A278.
- [19] R.C. Cornelis, H.M. Crews, J.A. Caruso, K.G. Heumann, *Introduction*, In : Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology, John Wiley & Sons, Ltd, **2004**, p. 1-5.



- [20] B. Meermann, M. Sperling, *Hyphenated techniques as tools for speciation analysis of metal-based pharmaceuticals: developments and applications*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 403 (6), **2012**. p. 1501-1522.
- [21] P. Jitaru, C. Barbante, *Elemental speciation analysis, from environmental to biochemical challenge*. Journal de Physique IV 139, **2006**. p. 269-294.
- [22] C. Bresson, F. Chartier, E. Ansoborlo, *The speciation in toxicology*. Actualite Chimique (367), **2012**. p. 26-33.
- [23] A.J. Alpert, *Hydrophilic-Interaction Chromatography For The Separation Of Peptides, Nucleic-Acids And Other Polar Compounds*. Journal of Chromatography 499 (1), **1990**. p. 177-196.
- [24] B. Buszewski, S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 402 (1), **2012**. p. 231-247.
- [25] P. Hemstrom, K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Separation Science 29 (12), **2006**. p. 1784-1821.
- [26] G. Greco, T. Letzel, *Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations*. Journal of Chromatographic Science 51 (7), **2013**. p. 684-693.
- [27] P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review*. Analytica Chimica Acta 692 (1-2), **2011**. p. 1-25.
- [28] D.V. Mc Calley, *Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A 1217 (20), **2010**. p. 3408-3417.
- [29] R.I. Chirita, C. West, A.L. Finaru, C. Elfakir, *Approach to hydrophilic interaction chromatography column selection: Application to neurotransmitters analysis*. Journal of Chromatography A 1217 (18), **2010**. p. 3091-3104.
- [30] M.R. Gama, R.G.D. Silva, C.H. Collins, C.B.G. Bottoli, *Hydrophilic interaction chromatography*. Trac-Trends in Analytical Chemistry 37 (1), **2012**. p. 48-60.
- [31] P. Jandera, *Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis-A review*. Journal of Chromatography A 1313, **2013**. p. 37-53.
- [32] M. Jonnada, R. Rathnasekara, Z. El Rassi, *Recent advances in nonpolar and polar organic monoliths for HPLC and CEC*. Electrophoresis 36 (1), **2015**. p. 76-100.
- [33] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, *Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography*. Journal of chromatography A 1357 (SI), **2014**. p. 36-52.
- [34] D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure*. Journal of Separation Science 29 (12), **2006**. p. 1836-1848.
- [35] M. Liu, J. Ostovic, E.X. Chen, N. Cauchon, *Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent*. Journal of Chromatography A 1216 (12), **2009**. p. 2362-2370.
- [36] Y. Guo, S. Gaiki, *Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A 1074 (1-2), **2005**. p. 71-80.
- [37] Y. Guo, S. Gaiki, *Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A 1218 (35), **2011**. p. 5920-5938.

- [38] H.P. Nguyen, K.A. Schug, *The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications*. Journal of Separation Science 31 (9), **2008**. p. 1465-1480.
- [39] G. Weber, N. von Wiren, H. Hayen, *Hydrophilic interaction chromatography of small metal species in plants using sulfobetaine- and phosphorylcholine-type zwitterionic stationary phases*. Journal of Separation Science 31 (9), **2008**. p. 1615-1622.
- [40] S.C. Churms, *Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction*. Journal of Chromatography A 720 (1-2), **1996**. p. 75-91.
- [41] S.C. Lin, W.C. Lee, *Separation of a fructo-oligosaccharide mixture by hydrophilic interaction chromatography using silica-based micropellicular sorbents*. Journal of Chromatography A 803 (1-2), **1998**. p. 302-306.
- [42] V.V. Tolstikov, O. Fiehn, *Analysis of highly polar compounds of plant origin: Combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry*. Analytical Biochemistry 301 (2), **2002**. p. 298-307.
- [43] B.Y. Zhu, C.T. Mant, R.S. Hodges, *Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns*. Journal of Chromatography 548 (1-2), **1991**. p. 13-24.
- [44] T.J. Higley, T. Yoshida, *Separation of peptides by hydrophilic interaction chromatography using TSKgel amide-80*. Lc Gc North America, **2003**. p. 20-21.
- [45] S. Schiesel, M. Lammerhofer, W. Lindner, *Multitarget quantitative metabolic profiling of hydrophilic metabolites in fermentation broths of beta-lactam antibiotics production by HILIC-ESI-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396 (5), **2010**. p. 1655-1679.
- [46] B. Preinerstorfer, S. Schiesel, M.L. Lammerhofer, W. Lindner, *Metabolic profiling of intracellular metabolites in fermentation broths from beta-lactam antibiotics production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods*. Journal of Chromatography A 1217 (3), **2010**. p. 312-328.
- [47] G. Le Rouzo, C. Lamouroux, C. Bresson, A. Guichard, P. Moisy, G. Moutiers, *Hydrophilic interaction liquid chromatography for separation and quantification of selected room-temperature ionic liquids*. Journal of Chromatography A 1164 (1-2), **2007**. p. 139-144.
- [48] J. Hmelnickis, O. Pugovics, H. Kazoka, A. Viksna, I. Susinskis, K. Kokums, *Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48 (3), **2008**. p. 649-656.
- [49] M. Yamashita, J.B. Fenn, *Electrospray ion-source - another variation on the free-jet theme*. Journal of Physical Chemistry 88 (20), **1984**. p. 4451-4459.
- [50] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, *Molecular beams of macroions*. Journal of Chemical Physics 49 (5), **1968**. p. 2240-2249.
- [51] S.J. Gaskell, *Electrospray: Principles and practice*. Journal of Mass Spectrometry 32 (7), **1997**. p. 677-688.
- [52] M. Holcapek, R. Jirasko, M. Lisa, *Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques*. Journal of Chromatography A 1259, **2012**. p. 3-15.
- [53] J. Szpunar, R. Lobinski, A. Prange, *Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems*. Applied Spectroscopy 57 (3), **2003**. p. 102A-112A.

- [54] E.J. Maxwell, D.D.Y. Chen, *Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta* 627 (1), **2008**. p. 25-33.
- [55] R.N. Collins, *Separation of low-molecular mass organic acid-metal complexes by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A* 1059 (1-2), **2004**. p. 1-12.
- [56] A.L. Gray, *The icp as an ion-source - origins, achievements and prospects*. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 40 (10-12), **1985**. p. 1525-1537.
- [57] M. Potin-Gautier, H. Paucot, *ICP-MS : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie de masse*. *Techniques de l'ingénieur Spectrométries TIB390DUO* (p2720), **2010**. p. 1-8.
- [58] L. Vio, G. Cretier, F. Chartier, V. Geertsens, A. Gourgiotis, H. Isnard, J.L. Rocca, *Separation and analysis of lanthanides by isotachopheresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Talanta* 99, **2012**. p. 586-593.
- [59] R. Kautenburger, C. Hein, J.M. Sander, H.P. Beck, *Influence of metal loading and humic acid functional groups on the complexation behavior of trivalent lanthanides analyzed by CE-ICP-MS*. *Analytica Chimica Acta* 816 (1), **2014**. p. 50-59.
- [60] F. Gueguen, H. Isnard, A. Nonell, L. Vio, T. Vercouter, F. Chartier, *Neodymium isotope ratio measurements by LC-MC-ICPMS for nuclear applications: investigation of isotopic fractionation and mass bias correction*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30 (2), **2015**. p. 443-452.
- [61] M. Bourgeois, H. Isnard, A. Gourgiotis, G. Stadelmann, C. Gautier, S. Mialle, A. Nonell, F. Chartier, *Sm isotope composition and Sm/Eu ratio determination in an irradiated Eu-153 sample by ion exchange chromatography-quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry combined with double spike isotope dilution technique*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (8), **2011**. p. 1660-1666.
- [62] J.L. Todoli, J.M. Mermet, *Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS*. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 61 (3), **2006**. p. 239-283.
- [63] J.M. Mermet, P. Bienvenu, J. Amiel, J.C. Birolleau, G. Fuchs, G. Garnier, *Guide de validation en spectrométrie atomique*, **2011**.
- [64] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercouter, F. Chartier, *Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Theoretical considerations*. *Analytica Chimica Acta* 885 (1), **2015**. p. 33-56.
- [65] Y. Nygren, E. Bjorn, *Mobile phase selection for the combined use of liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray ionisation mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A* 1217 (30), **2010**. p. 4980-4986.
- [66] R. Lobinski, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*. *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2), **2006**. p. 255-289.
- [67] D. Cleveland, S.E. Long, L.C. Sander, W.C. Davis, K.E. Murphy, R.J. Case, C.A. Rimmer, L. Francini, A.K. Patri, *Chromatographic methods for the quantification of free and chelated gadolinium species in MRI contrast agent formulations*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (7-8), **2010**. p. 2987-2995.
- [68] E. Moutiez, P. Prognon, P. Bourrinet, S. Zehaf, A. Dencausse, G. Mahuzier, *Time-resolved luminescence as a novel detection mode for the simultaneous high-*

- performance liquid chromatographic determination of gadolinium-DOTA and Gd<sup>3+</sup>*. Analyst 122 (11), **1997**. p. 1347-1352.
- [69] K. Kumar, K.V. Sukumaran, M.F. Tweedle, *Determination of free Gd<sup>3+</sup> as a cyclohexanediaminetetraacetic acid complex by reversed-phase HPLC in ionic gadolinium(III) chelates*. Analytical Chemistry 66 (2), **1994**. p. 295-299.
- [70] J.J. Hagan, S.C. Taylor, M.F. Tweedle, *Fluorescence Detection Of Gadolinium Chelates Separated by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography*. Analytical Chemistry 60 (6), **1988**. p. 514-516.
- [71] J. Behra-Miellet, G. Briand, M. Kouach, B. Gressier, M. Cazin, J.C. Cazin, *On-line HPLC electrospray ionization mass spectrometry: a pharmacological tool for identifying and studying the stability of Gd<sup>3+</sup> complexes used as magnetic resonance imaging contrast agents*. Biomedical Chromatography 12 (1), **1998**. p. 21-26.
- [72] M.F. Tweedle, J.J. Hagan, K. Kumar, S. Mantha, C.A. Chang, *Reaction of gadolinium chelates with endogenously available ions*. Magnetic Resonance Imaging 9 (3), **1991**. p. 409-415.
- [73] A. Mazzucotelli, V. Bavastello, E. Magi, P. Rivaro, C. Tomba, *Analysis of gadolinium polyaminopolycarboxylic complexes by HPLC-ultrasonic nebulizer-ICP-AES hyphenated technique*. Analytical Proceedings 32 (5), **1995**. p. 165-167.
- [74] C.L. Kahakachchi, D.A. Moore, *Speciation of gadolinium in gadolinium-based magnetic resonance imaging agents by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma optical emission spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 24 (10), **2009**. p. 1389-1396.
- [75] C.L. Kahakachchi, D.A. Moore, *Identification and characterization of gadolinium(III) complexes in biological tissue extracts*. Metallomics 2 (7), **2010**. p. 490-497.
- [76] T. Arbughi, F. Bertani, R. Celeste, A. Grotti, S. Sillari, P. Tirone, *High-performance liquid chromatographic determination of the magnetic resonance imaging contrast agent gadobenate ion in plasma, urine, faeces, bile and tissues*. Journal of Chromatography B 713 (2), **1998**. p. 415-426.
- [77] P.T. Normann, P. Joffe, I. Martinsen, H.S. Thomsen, *Quantification of gadodiamide as Gd in serum, peritoneal dialysate and faeces by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and comparative analysis by high-performance liquid chromatography*. Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis 22 (6), **2000**. p. 939-947.
- [78] M.M. Vora, S. Wukovnig, R.D. Finn, A.M. Emran, T.E. Boothe, P.J. Kothari, *Reversed-phase high-performance liquid-chromatographic determination of gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid complex*. Journal of Chromatography 369 (1), **1986**. p. 187-192.
- [79] E. Hvattum, P.T. Normann, G.C. Jamieson, J.J. Lai, T. Skotland, *Detection and quantitation of gadolinium chelates in human serum and urine by high-performance liquid-chromatography and postcolumn derivatization of gadolinium with Arsenazo-III*. Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis 13 (7), **1995**. p. 927-932.
- [80] H.J. Weinmann, M. Laniado, W. Mutzel, *Pharmacokinetics Of Gd-DTPA Dimeglumine After Intravenous-Injection Into Healthy-Volunteers*. Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR 16 (2), **1984**. p. 167-172.
- [81] M. Rabiet, M. Letouzet, S. Hassanzadeh, S. Simon, *Transmetallation of Gd-DTPA by Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in water: Batch experiments and coagulation-flocculation simulations*. Chemosphere 95, **2014**. p. 639-642.

- [82] V. Lorusso, I. Poggesi, T. Arbughi, D. Dalfiume, P. Tirone, *High-Performance Liquid-Chromatographic Assay Of The Magnetic-Resonance-Imaging Contrast Agent Gadobenate In Plasma, Urine And Bile*. Journal of Chromatography B-Biomedical Applications 656 (2), **1994**. p. 415-422.
- [83] V. Loreti, J. Bettmer, *Determination of the MRI contrast agent Gd-DTPA by SEC-ICP-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 379 (7-8), **2004**. p. 1050-1054.
- [84] E.M. Chellquist, C.M. Dicken, *The effect of mobile phase modifiers on the simultaneous lc elution of a gadolinium complex and free ligand*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 11 (2), **1993**. p. 139-143.
- [85] E.M. Chellquist, R. Searle, *An LC method for measuring complex-formation equilibria by competitive chelation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 11 (10), **1993**. p. 985-992.
- [86] T. Frenzel, P. Lengsfeld, H. Schirmer, J. Hutter, H.J. Weinmann, *Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Human Serum at 37 degrees C*. Investigative Radiology 43 (12), **2008**. p. 817-828.
- [87] P.T. Normann, P.A. Hals, *In vivo stability and excretion of gadodiamide (GdDTPA-BMA), a hydrophilic gadolinium complex used as a contrast enhancing agent for magnetic resonance imaging*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 20 (4), **1995**. p. 307-313.
- [88] R.A. Parise, D.R. Miles, M.J. Egorin, *Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for motexafin gadolinium and motexafin lutetium in human plasma*. Journal of Chromatography B 749 (2), **2000**. p. 145-152.
- [89] D. Miles, M. Mesfin, T. Mody, M. Stiles, J. Lee, J. Fiene, B. Denis, G. Boswell, *Validation and use of three complementary analytical methods (LC-FLS, LC-MS/MS and ICP-MS) to evaluate the pharmacokinetics, biodistribution and stability of motexafin gadolinium in plasma and tissues*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 385 (2), **2006**. p. 345-356.
- [90] N.M. Raut, P.G. Jaison, S.K. Aggarwal, *Comparative evaluation of three alpha-hydroxycarboxylic acids for the separation of lanthanides by dynamically modified reversed-phase high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A 959 (1-2), **2002**. p. 163-172.
- [91] C.H. Knight, R.M. Cassidy, B.M. Recoskie, L.W. Green, *Dynamic Ion-Exchange Chromatography For Determination Of Number Of Fissions In Thorium Uranium-Dioxide Fuels*. Analytical Chemistry 56 (3), **1984**. p. 474-478.
- [92] R. Garcia Fernandez, J.I. Garcia Alonso, *Separation of rare earth elements by anion-exchange chromatography using ethylenediaminetetraacetic acid as mobile phase*. Journal of Chromatography A 1180 (1-2), **2008**. p. 59-65.
- [93] J. Koester, R. Shi, N. von Wiren, G. Weber, *Evaluation of different column types for the hydrophilic interaction chromatographic separation of iron-citrate and copper-histidine species from plants*. Journal of Chromatography A 1218 (30), **2011**. p. 4934-4943.
- [94] R. Rellan-Alvarez, J. Giner-Martinez-Sierra, J. Orduna, I. Orera, J.A. Rodriguez-Castrillon, J.I. Garcia-Alonso, J. Abadia, A. Alvarez-Fernandez, *Identification of a Tri-Iron(III), Tri-Citrate Complex in the Xylem Sap of Iron-Deficient Tomato Resupplied with Iron: New Insights into Plant Iron Long-Distance Transport*. Plant and Cell Physiology 51 (1), **2010**. p. 91-102.
- [95] Y. Xuan, E.B. Scheuermann, A.R. Meda, H. Hayen, N. von Wiren, G. Weber, *Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to*

- electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 1136 (1), **2006**. p. 73-81.
- [96] T. Grevenstuk, P. Flis, L. Ouerdane, R. Lobinski, A. Romano, *Identification of the tri-Al tricitrate complex in Plantago almogravensis by hydrophilic interaction LC with parallel ICP-MS and electrospray Orbitrap MS/MS detection*. Metallomics 5 (9), **2013**. p. 1285-1293.
- [97] L. Zheng, D.G. Watson, J.N.A. Tettey, C.A. Clements, *The determination of iron as its EDTA complex in Helix aspera by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to Fourier transform electrospray ionisation mass spectrometry*. Talanta 76 (5), **2008**. p. 1165-1169.
- [98] Z. Pedrero, L. Ouerdane, S. Mounicou, R. Lobinski, M. Monperrus, D. Amouroux, *Identification of mercury and other metals complexes with metallothioneins in dolphin liver by hydrophilic interaction liquid chromatography with the parallel detection by ICP MS and electrospray hybrid linear/orbital trap MS/MS*. Metallomics 4 (5), **2012**. p. 473-479.
- [99] P. Hemstrom, Y. Nygren, E. Bjorn, K. Irgum, *Alternative organic solvents for HILIC separation of cisplatin species with on-line ICP-MS detection*. Journal of Separation Science 31 (4), **2008**. p. 599-603.
- [100] T. Falta, G. Koellensperger, A. Sandler, W. Buchberger, R.M. Mader, S. Hann, *Quantification of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in spiked human plasma samples by ICP-SFMS and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) combined with ICP-MS detection*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 24 (10), **2009**. p. 1336-1342.
- [101] Y. Nygren, P. Hemstroem, C. Astot, P. Naredi, E. Bjoern, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) utilizing a mobile phase with a low-volatile organic modifier for the determination of cisplatin, and its monohydrolyzed metabolite*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 23 (7), **2008**. p. 948-954.
- [102] J. Vidmar, A. Martincic, R. Milacic, J. Scancar, *Speciation of cisplatin in environmental water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*. Talanta 138, **2015**. p. 1-7.
- [103] M. Dernovics, J. Far, R. Lobinski, *Identification of anionic selenium species in Se-rich yeast by electrospray QTOF MS/MS and hybrid linear ion trap/orbitrap MSn*. Metallomics 1 (4), **2009**. p. 317-329.
- [104] F. Aureli, L. Ouerdane, K. Bierla, J. Szpunar, N.T. Prakash, F. Cubadda, *Identification of selenosugars and other low-molecular weight selenium metabolites in high-selenium cereal crops*. Metallomics 4 (9), **2012**. p. 968-978.
- [105] M. Dernovics, R. Lobinski, *Speciation analysis of selenium metabolites in yeast-based food supplements by ICPMS - Assisted hydrophilic interaction HPLC - Hybrid linear ion trap/orbitrap MS(n)*. Analytical Chemistry 80 (11), **2008**. p. 3975-3984.
- [106] J. Far, H. Preud'homme, R. Lobinski, *Detection and identification of hydrophilic selenium compounds in selenium-rich yeast by size exclusion-microbore normal-phase HPLC with the on-line ICP-MS and electrospray Q-TOF-MS detection*. Analytica Chimica Acta 657 (2), **2010**. p. 175-190.
- [107] M. Klein, L. Ouerdane, M. Bueno, F. Pannier, *Identification in human urine and blood of a novel selenium metabolite, Se-methylselenoneine, a potential biomarker of metabolism in mammals of the naturally occurring selenoneine, by HPLC*

- coupled to electrospray hybrid linear ion trap-orbital ion trap MS*. Metallomics 3 (5), **2011**. p. 513-520.
- [108] L. Ouerdane, F. Aureli, P. Flis, K. Bierla, H. Preud'homme, F. Cubadda, J. Szpunar, *Comprehensive speciation of low-molecular weight selenium metabolites in mustard seeds using HPLC - electrospray linear trap/orbitrap tandem mass spectrometry*. Metallomics 5 (9), **2013**. p. 1294-1304.
- [109] D. Xie, J. Mattusch, R. Wennrich, *Retention of arsenic species on zwitterionic stationary phase in hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Separation Science 33 (6-7), **2010**. p. 817-825.
- [110] D. Xie, J. Mattusch, R. Wennrich, *Separation of Organoarsenicals by Means of Zwitterionic Hydrophilic Interaction Chromatography (ZIC (R)-HILIC) and Parallel ICP-MS/ESI-MS Detection*. Engineering in Life Sciences 8 (6), **2008**. p. 582-588.
- [111] W.Y. Lee, Y.H. Yim, E. Hwang, Y. Lim, T.K. Kim, K.S. Lee, *Development of Isotope Dilution LC-MS/MS Method for Accurate Determination of Arsenobetaine in Oyster Certified Reference Material*. Bulletin of the Korean Chemical Society 35 (3), **2014**. p. 821-827.
- [112] T. Sano, H. Takagi, K. Nagano, M. Nishikawa, *Analysis of triorganotin compounds in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 1217 (26), **2010**. p. 4344-4346.
- [113] L. Telgmann, C.A. Wehe, J. Kunнемeyer, A.C. Bulter, M. Sperling, U. Karst, *Speciation of Gd-based MRI contrast agents and potential products of transmetalation with iron ions or parenteral iron supplements*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (8), **2012**. p. 2133-2141.
- [114] M. Birka, C.A. Wehe, L. Telgmann, M. Sperling, U. Karst, *Sensitive quantification of gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agents in surface waters using hydrophilic interaction liquid chromatography and inductively coupled plasma sector field mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 1308 (1), **2013**. p. 125-131.
- [115] L. Telgmann, C.A. Wehe, M. Birka, J. Kunнемeyer, S. Nowak, M. Sperling, U. Karst, *Speciation and Isotope Dilution Analysis of Gadolinium-Based Contrast Agents in Wastewater*. Environmental Science & Technology 46 (21), **2012**. p. 11929-11936.
- [116] J. Kunнемeyer, L. Terborg, B. Meermann, C. Brauckmann, I.M.A. Scheffer, U. Karst, *Speciation Analysis of Gadolinium Chelates in Hospital Effluents and Wastewater Treatment Plant Sewage by a Novel HILIC/ICP-MS Method*. Environmental Science & Technology 43 (8), **2009**. p. 2884-2890.
- [117] J. Kunнемeyer, L. Terborg, S. Nowak, A. Scheffer, L. Telgmann, F. Tokmak, A. Gunsel, G. Wiesmuller, S. Reichelt, U. Karst, *Speciation Analysis of Gadolinium-Based MRI Contrast Agents in Blood Plasma by Hydrophilic Interaction Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry 80 (21), **2008**. p. 8163-8170.
- [118] C.S.K. Raju, A. Cossmer, H. Scharf, U. Panne, D. Luck, *Speciation of gadolinium based MRI contrast agents in environmental water samples using hydrophilic interaction chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 25 (1), **2010**. p. 55-61.
- [119] U. Lindner, J. Lingott, S. Richter, N. Jakubowski, U. Panne, *Speciation of gadolinium in surface water samples and plants by hydrophilic interaction chromatography*

- hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 405 (6), **2013**. p. 1865-1873.
- [120] U. Lindner, J. Lingott, S. Richter, W. Jiang, N. Jakubowski, U. Panne, *Analysis of Gadolinium-based contrast agents in tap water with a new hydrophilic interaction chromatography (ZIC-cHILIC) hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (9), **2015**. p. 2415-2422.
- [121] R.S. Houk, *Electrospray and ICP-mass spectrometry: enemies or allies?* Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy 53 (2), **1998**. p. 267-271.
- [122] P. Giusti, D. Schaumlöffel, J.R. Encinar, J. Szpunar, *Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 20 (10), **2005**. p. 1101-1107.
- [123] H. Preud'homme, J. Far, S. Gil-Casal, R. Lobinski, *Large-scale identification of selenium metabolites by online size-exclusion-reversed phase liquid chromatography with combined inductively coupled plasma (ICP-MS) and electrospray ionization linear trap-Orbitrap mass spectrometry (ESI-MS<sup>n</sup>)*. Metallomics 4 (5), **2012**. p. 422-432.
- [124] S.G. Casal, J. Far, K. Bierla, L. Ouerdane, J. Szpunar, *Study of the Se-containing metabolomes in Se-rich yeast by size-exclusion-cation-exchange HPLC with the parallel ICP MS and electrospray orbital ion trap detection*. Metallomics 2 (8), **2010**. p. 535-548.
- [125] K. Bluemlein, E.M. Krupp, J. Feldmann, *Advantages and limitations of a desolvation system coupled online to HPLC-ICPqMS/ES-MS for the quantitative determination of sulfur and arsenic in arseno-peptide complexes*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 24 (1), **2009**. p. 108-113.
- [126] K. Bluemlein, A. Raab, J. Feldmann, *Stability of arsenic peptides in plant extracts: off-line versus on-line parallel elemental and molecular mass spectrometric detection for liquid chromatographic separation*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 393 (1), **2009**. p. 357-366.
- [127] K. Bluemlein, A. Raab, A.A. Meharg, J.M. Charnock, J. Feldmann, *Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC-ICP-MS and LC-ES-MS/ICP-MS with XANES/EXAFS in analysis of Thunbergia alata*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 390 (7), **2008**. p. 1739-1751.
- [128] A. Raab, H. Schat, A.A. Meharg, J. Feldmann, *Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (Helianthus annuus): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations*. New Phytologist 168 (3), **2005**. p. 551-558.
- [129] A. Raab, J. Feldmann, A.A. Meharg, *The nature of arsenic-phytochelatin complexes in Holcus lanatus and Pteris cretica*. Plant Physiology 134 (3), **2004**. p. 1113-1122.
- [130] A. Raab, A.A. Meharg, M. Jaspars, D.R. Genney, J. Feldmann, *Arsenic-glutathione complexes - their stability in solution and during separation by different HPLC modes*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 19 (1), **2004**. p. 183-190.
- [131] G.L. Sacks, L.A. Derry, J.T. Brenna, *Elemental speciation by parallel elemental and molecular mass spectrometry and peak profile matching*. Analytical Chemistry 78 (24), **2006**. p. 8445-8455.
- [132] G. Greco, S. Grosse, T. Letzel, *Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids*. Journal of Chromatography A 1235 (1), **2012**. p. 60-67.



- [133] Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamoto, N. Tanaka, *Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency*. Journal of Chromatography A 1218 (35), **2011**. p. 5903-5919.
- [134] B. Chauve, D. Guillarme, P. Cleon, J.L. Veuthey, *Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds*. Journal of Separation Science 33 (6-7), **2010**. p. 752-764.
- [135] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Basic Concepts and the Control of Separation*, In : Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, Inc., **2010**, p. 19-86.
- [136] K. Kalikova, P. Kozlik, M. Gilar, E. Tesarova, *Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns*. Journal of Separation Science 36 (15), **2013**. p. 2421-2429.
- [137] A.J. Alpert, *Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides*. Analytical Chemistry 80 (1), **2008**. p. 62-76.
- [138] C.J. Welch, N.J. Wu, M. Biba, R. Hartman, T. Brkovic, X.Y. Gong, R. Helmy, W. Schafer, J. Cuff, Z. Pirzada, L.L. Zhou, *Greening analytical chromatography*. Trac-Trends in Analytical Chemistry 29 (7), **2010**. p. 667-680.
- [139] C. Moulin, B. Amekraz, V. Steiner, G. Plancque, E. Ansoborlo, *Speciation studies on DTPA using the complementary nature of electrospray ionization mass spectrometry and time-resolved laser-induced fluorescence*. Applied Spectroscopy 57 (9), **2003**. p. 1151-1161.
- [140] C. Moulin, B. Amekraz, S. Colette, D. Doizi, C. Jacopin, C. Lamouroux, G. Plancque, *Electrospray mass spectrometry for actinides and lanthanide speciation*. Journal of Alloys and Compounds 408 (1), **2006**. p. 1242-1245.
- [141] I. Lavagnini, F. Magno, R. Seraglia, P. Traldi, *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*, Wiley, **2006**.
- [142] V.B. Di Marco, G.G. Bombi, *Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal-ligand solution equilibria*. Mass Spectrometry Reviews 25 (3), **2006**. p. 347-379.
- [143] M.J. Keith-Roach, *A review of recent trends in electrospray ionisation-mass spectrometry for the analysis of metal-organic ligand complexes*. Analytica Chimica Acta 678 (2), **2010**. p. 140-148.
- [144] R. Jirasko, M. Holcapek, *Structural analysis of organometallic compounds with soft ionization mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews 30 (6), **2011**. p. 1013-1036.
- [145] D. Schaumlöffel, A. Tholey, *Recent directions of electrospray mass spectrometry for elemental speciation analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 400 (6), **2011**. p. 1645-1652.
- [146] C. Bresson, C. Colin, F. Chartier, C. Moulin, *Cobalt speciation study in the cobalt-cysteine system by electrospray ionization mass spectrometry and anion-exchange chromatography inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. Applied Spectroscopy 59 (5), **2005**. p. 696-705.
- [147] V.B. Di Marco, L. Raveane, A. Dean, P. Traldi, *Perturbations produced by electrospray ionization mass spectrometry in the speciation of aluminium(III)/1,6-dimethyl-4-hydroxy-3-pyridinecarboxylate aqueous solutions*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 24 (7), **2010**. p. 868-874.

- [148] V.B. Di Marco, G.G. Bombi, M. Tubaro, P. Traldi, *Electrospray ionization mass spectrometry in studies of aluminium(III)-ligand solution equilibria*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 17 (18), **2003**. p. 2039-2046.
- [149] T. Urabe, M. Tanaka, S. Kumakura, T. Tsugoshi, *Study on chemical speciation in aluminum chloride solution by ESI-Q-MS*. Journal of Mass Spectrometry 42 (5), **2007**. p. 591-597.
- [150] T. Urabe, T. Tsugoshi, W. Tanakaa, *Characterization of aluminum species with nitrate, perchlorate and sulfate ions in the positive and negative ion mode by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry 44 (2), **2009**. p. 193-202.
- [151] N. Burford, M.D. Eelman, K. Groom, *Identification of complexes containing glutathione with As(III), Sb(III), Cd(II), Hg(II), Tl(I), Pb(II) or Bi(III) by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Inorganic Biochemistry 99 (10), **2005**. p. 1992-1997.
- [152] J.J. Dytrtova, M. Jakl, D. Schroder, *Complexation of malic acid with cadmium(II) probed by electrospray ionization mass spectrometry*. Talanta 90, **2012**. p. 63-68.
- [153] K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, E. Lipiec, *Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS*. Talanta 72 (4), **2007**. p. 1564-1572.
- [154] S. Mostapha, F. Fontaine-Vive, L. Berthon, N. Boubals, N. Zorz, P.L. Solari, M.C. Charbonnel, C. Den Auwer, *On the structure of thorium and americium adenosine triphosphate complexes*. International Journal of Radiation Biology 90 (11), **2014**. p. 966-974.
- [155] L.W. McDonald, J.A. Campbell, S.B. Clark, *Failure of ESI Spectra to Represent Metal-Complex Solution Composition: A Study of Lanthanide-Carboxylate Complexes*. Analytical Chemistry 86 (2), **2014**. p. 1023-1029.
- [156] N.G. Tsierkezos, J. Roithova, D. Schroder, M. Oncak, P. Slavicek, *Can Electrospray Mass Spectrometry Quantitatively Probe Speciation? Hydrolysis of Uranyl Nitrate Studied by Gas-Phase Methods*. Inorganic Chemistry 48 (13), **2009**. p. 6287-6296.
- [157] S. Pasilis, A. Somogyi, K. Herrmann, J.E. Pemberton, *Ions generated from uranyl nitrate solutions by electrospray ionization (ESI) and detected with Fourier transform ion-cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 17 (2), **2006**. p. 230-240.
- [158] C. Jacopin, M. Sawicki, G. Plancque, D. Doizi, F. Taran, E. Ansoborlo, B. Amekraz, C. Moulin, *Investigation of the interaction between 1-hydroxyethane-1,1'-diphosphonic acid (HEDP) and uranium(VI)*. Inorganic Chemistry 42 (16), **2003**. p. 5015-5022.
- [159] C. Moulin, B. Amekraz, S. Hubert, V. Moulin, *Study of thorium hydrolysis species by electrospray-ionization mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 441 (2), **2001**. p. 269-279.
- [160] A.J. Cartwright, C.C. May, P.J. Worsfold, M.J. Keith-Roach, *Characterisation of thorium-ethylenediaminetetraacetic acid and thorium-nitrilotriacetic acid species by electrospray ionisation-mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 590 (1), **2007**. p. 125-131.
- [161] C. Lamouroux, S. Rateau, C. Moulin, *Use of electrospray ionization mass spectrometry for the study of WHO complexation and extraction speciation with calixarene-CMPO in the fuel partitioning concept*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 20 (13), **2006**. p. 2041-2052.

- [162] S. Colette, B. Amekraz, C. Madic, L. Berthon, G. Cote, C. Moulin, *Trivalent lanthanide interactions with a terdentate bis(dialkyltriazinyl)pyridine ligand studied by electrospray ionization mass spectrometry*. Inorganic Chemistry 42 (7), **2003**. p. 2215-2226.
- [163] G.S. Groenewold, A.D. Sauter, A.D. Sauter, *Rapid Analysis of Single Droplets of Lanthanide-Ligand Solutions by Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using an Induction-Based Fluidics Source*. Analytical Chemistry 85 (13), **2013**. p. 6398-6404.
- [164] L. Berthon, N. Zorz, B. Gannaz, S. Lagrave, T. Retegan, A. Fermvik, C. Ekberg, *Use of electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of actinide complexes in solution*. Actinides 2009 9 (1), **2010**. p. 8.
- [165] T. Retegan, L. Berthon, C. Ekberg, A. Fermvik, G. Skarnemark, N. Zorz, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry Investigation of BTBP - Lanthanide(III) and Actinide(III) Complexes*. Solvent Extraction and Ion Exchange 27 (5-6), **2009**. p. 663-682.
- [166] T. Vercoeur, B. Amekraz, C. Moulin, E. Giffaut, P. Vitorge, *Sulfate complexation of trivalent lanthanides probed by nanoelectrospray mass spectrometry and time-resolved laser-induced luminescence*. Inorganic Chemistry 44 (21), **2005**. p. 7570-7581.
- [167] J. Kunнемeyer, L. Terborg, S. Nowak, L. Telgmann, F. Tokmak, B.K. Kramer, A. Gunsel, G.A. Wiesmuller, J. Waldeck, C. Bremer, U. Karst, *Analysis of the Contrast Agent Magnevist and Its Transmetalation Products in Blood Plasma by Capillary Electrophoresis/Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry 81 (9), **2009**. p. 3600-3607.
- [168] M. Berglund, M.E. Wieser, *Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry 83 (2), **2011**. p. 397-410.
- [169] F. Chartier, H. Isnard, A. Nonell, *Analyses isotopiques par spectrométrie de masse Méthodes et applications*. Techniques de l'ingénieur Analyses de surface et de matériaux base documentaire : TIB383DUO (ref. article : p3740), **2014**. p.
- [170] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Qualitative and Quantitative Analysis*, In : Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, Inc., **2010**, p. 499-530.
- [171] C.X. Liu, B. Hu, J.B. Shi, J.Q. Li, X.L. Zhang, H.W. Chen, *Determination of uranium isotopic ratio (U-235/U-238) using extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 26 (10), **2011**. p. 2045-2051.
- [172] M.E. Ketterer, J.P. Guzowski, *Isotope ratio measurements with elemental-mode electrospray mass spectrometry*. Analytical Chemistry 68 (5), **1996**. p. 883-887.
- [173] M.C.B. Moraes, J. Neto, C.L. do Lago, *Boron isotopic ratio by electrospray mass spectra of tetrafluoroborate - Part 1. Instrumental conditions, data acquisition, memory effect, and ion stability*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 16 (11), **2001**. p. 1259-1265.
- [174] J. Meija, *Mathematical tools in analytical mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 385 (3), **2006**. p. 486-499.
- [175] M.C. Moraes, J. Neto, V.F. Juliano, C.L. do Lago, *Eliminating the interference of M-nH ions in isotope patterns from low-resolution mass spectra*. International Journal of Mass Spectrometry 178 (3), **1998**. p. 129-141.
- [176] J. Meija, J.A. Caruso, *Deconvolution of isobaric interferences in mass spectra*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 15 (5), **2004**. p. 654-658.

- [177] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercoüter, F. Chartier, *Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations*. *Analytica Chimica Acta* 885 (1), **2015**. p. 57-91.
- [178] M. Wind, W.D. Lehmann, *Element and molecular mass spectrometry - an emerging analytical dream team in the life sciences*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19 (1), **2004**. p. 20-25.
- [179] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks*. *Analytical Chemistry* 55 (4), **1983**. p. 730-737.
- [180] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Rafols, M. Roses, E. Bosch, *delta Conversion parameter between pH scales ((s)(w)pH and (s)(s)pH) in acetonitrile/water mixtures at various compositions and temperatures*. *Analytical Chemistry* 79 (8), **2007**. p. 3180-3187.